

## RESSALVA

Alertamos para ausência das páginas 12 a 47 não incluídas pelo autor no arquivo original.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**“JULIO DE MESQUITA FILHO”**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**CÂMPUS DE ARARAQUARA**

**CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E MOLECULAR DE  
QUATRO CEPAS DE *Trypanosoma cruzi* CHAGAS,  
1909 (KINETOPLASTIDA, TRYPANOSOMATIDAE)  
ISOLADAS DE PACIENTES CHAGÁSICOS  
CRÔNICOS**

**MARIA APARECIDA DA SILVA**

**ORIENTADOR: PROF. DR. JOÃO ARISTEU DA ROSA**

**ARARAQUARA – SP  
2004**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**“JULIO DE MESQUITA FILHO”**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**CÂMPUS DE ARARAQUARA**

**CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E MOLECULAR DE  
QUATRO CEPAS DE *Trypanosoma cruzi* CHAGAS,  
1909 (KINETOPLASTIDA, TRYPANOSOMATIDAE)  
ISOLADAS DE PACIENTES CHAGÁSICOS  
CRÔNICOS**

**MARIA APARECIDA DA SILVA**

**Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em  
Análises Clínicas, Área de Análises Clínicas da  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP,  
para obtenção do título de Doutor em Análises  
Clínicas.**

**Orientador: Prof. Dr. JOÃO ARISTEU DA ROSA**

**ARARAQUARA – SP  
2004**

## **BANCA EXAMINADORA**

### **TITULARES:**

Prof. Dr. JOÃO ARISTEU DA ROSA – Presidente e Orientador  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP – Araraquara – SP

Prof. Dr. JOÃO CLÓVIS DO PRADO JÚNIOR  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP – Ribeirão Preto – SP

Prof<sup>a</sup>. Dra. MÁRCIA APARECIDA SPERANÇA  
Faculdade de Medicina de Marília – FAMEMA – Marília – SP

Prof<sup>a</sup>. Dra. MARA CRISTINA PINTO  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP – Araraquara – SP

Prof<sup>a</sup>. Dra. VERA LUCY DE SANTI ALVARENGA  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP – Araraquara – SP

### **SUPLENTES:**

Prof. Dr. SÉRGIO DE ALBUQUERQUE  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP – Ribeirão Preto – SP

Prof. Dr. ANTONIO FLUMINHAN JÚNIOR  
Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE – Presidente Prudente – SP

Prof. Dr. PAULO INÁCIO DA COSTA  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP – Araraquara - SP

**A DEUS, fonte da minha vida**

**A meus pais, MÁRIO E HILDA,**

**Aos meus irmãos e sobrinhos,**

**pelo carinho, amor e estímulo**

**recebidos,**

**dedico este trabalho.**

## **AGRADECIMENTOS**

A DEUS, pela presença constante em minha vida e pela força e persistência nos momentos difíceis.

Ao Professor Dr. JOÃO ARISTEU DA ROSA, pela amizade, oportunidade, confiança e pelo otimismo durante a orientação deste trabalho.

À Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE, e à diretoria da Faculdade de Farmácia e Bioquímica, pelo apoio e concessão de dispensa para a realização deste trabalho.

Ao Dr. OCTÁVIO FERNANDES, por colocar seu laboratório e seus conhecimentos à minha inteira disposição para execução de uma etapa deste trabalho.

Ao Dr. ADEILTON BRANDRÃO e às Dras. REGINA HELENA MANGIA e PATRÍCIA CUERVO pela oportunidade de realizar este trabalho em seu laboratório e poder compartilhar de seus conhecimentos.

À Dra. GISELE ALBORGUETTI NAI, pela realização dos exames anatomopatológicos e pelo auxílio e disponibilidade nos momentos solicitados.

Aos professores JOSÉ MARIA BERTÃO, MARA SÍLVIA RIBEIRO DE MORAES, ANTONIO FLUMINHAN JÚNIOR, SILVÉRIO TEIXEIRA DOS SANTOS e HERMANN BREMER NETO pela disponibilidade e auxílio em fases importantes desse trabalho.

À amiga ANA RITA PALADINO TUMITAN, pelo incentivo e pelo auxílio na coleta de material para exames anatomopatológicos.

Aos técnicos de laboratório GILMAR ALVES DE OLIVEIRA, JOSÉ TRICOTE e ZIZELDA MARY DA CRUZ PEDRO ALMEIDA, pela dedicação e apoio na manipulação dos animais.

Aos técnicos de laboratório LÍDIA FERRO, RENATA DOS SANTOS VOLPATO, CARLOS ALEXANDRE SANTANA DE OLIVEIRA, LUCIMEIRE CONTRERAS e PAULINO JESUS QUATROCHE pela confecção das lâminas para o exame anatomopatológico.

Às amigas MARIA ZENAIDE TITA FERNANDES e ISABEL MARTINEZ, pelo esclarecimento e ajuda na parte experimental deste trabalho.

Aos Drs. ARNALDO BUAINAIN, FRANCISCO MIGUEL BELDA NETO, JOÃO FLÁVIO GIAZZI e ARLETE SCRASSOLO MARTINI, que realizaram o isolamento das cepas.

Aos funcionários do Biotério Central da UNOESTE que forneceram os animais utilizados em nossos experimentos.

Ao Professores LUIZ CARLOS WRUCK, SÉRGIO KRONKA, DENISE Di GIOVANI LAMBERTI e WILSON LUÍS DE OLIVEIRA pelo tratamento estatístico dos resultados deste trabalho.

Às amigas MÉRCIA DE CARVALHO ALMEIDA, NAIR TOSHIKO TASHIMA, CLÁUDIA ALVAREZ CALVO ALESSI, SELMA DE BASTOS ZAMBELLI FREITAS, FLÁVIA NORIS CHAGAS LELI, LUCIANA MOLEIRO RIBAS BURGO, CÍCERA ANSELMO DA SILVA FORTUNATO e LUCIMAR BATISTA, pelo incentivo e apoio.

Aos meus sobrinhos, ANDRÉIA DE FÁTIMA KUBACKI, ANGELA CRISTINA KUBACKI, ANA FLÁVIA KUBACKI, VINÍCIUS HENRIQUE GOMES, GUILHERME RENATO GOMES e LEONARDO AUGUSTO GOMES, por existirem e por darem sentido à minha vida.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, seja pelo apoio técnico, financeiro, psicológico ou espiritual.

Muito obrigada.

“Há homens que lutam um dia

e são bons

Há outros que lutam um ano

e são melhores

Há os que lutam muitos anos

e são muito bons

Porém, há os que lutam toda a vida

Esses são os imprescindíveis”

Bertolt Brecht



# RESUMO

---

*Trypanosoma cruzi* é um protozoário flagelado causador da doença de Chagas que, segundo estimativas da OMS afeta 16-18 milhões de pessoas na América Latina, causando danos sociais extremamente graves. A doença apresenta formas clínicas variadas que incluem a forma indeterminada, cardiomiopatia e alterações digestivas. Variações intraespecíficas nas diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi* estudadas foram demonstradas em nível morfo-biológico, bioquímico e genético. Essa heterogeneidade poderia explicar a variabilidade nas manifestações clínicas da doença de Chagas e as diferenças regionais de sua morbidade. Com o objetivo de caracterizar quatro cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas de pacientes chagásicos crônicos, residentes na região de Araraquara – SP, parâmetros biológicos e moleculares foram avaliados. Para estudar o comportamento biológico das cepas, três grupos de camundongos *Swiss*, não isogênicos, pesando 10-12g foram infectados com formas sangüíneas das cepas em estudo. Foram avaliados os seguintes aspectos: período pré-patente, curvas de parasitemia, morfologia do parasita no sangue periférico, taxas de mortalidade e lesões histopatológicas. Três cepas apresentaram parasitemia patente com períodos pré-patentes variáveis, baixa parasitemia e formas tripomastigotas largas durante todo o curso da infecção. Uma cepa apresentou parasitemia sub-patente. Nenhum animal morreu durante o período do estudo. Exame histopatológico mostrou ninhos de formas amastigotas no coração de animais infectados para duas cepas e inflamação em vários órgãos para todas as cepas. Para a caracterização molecular o DNA do parasita foi extraído de formas epimastigotas mantidas em meio LIT. Parte do espaçador não transcrito do gene de mini-exon foi amplificado por PCR. Todas as cepas geraram produtos com 250 pb. Os dados biológicos e moleculares permitiram a classificação de todas as cepas como *T.cruzi* II.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, doença de Chagas, cepa, Biodema, PCR multiplex, *T.cruzi* II.

# ABSTRACT

---

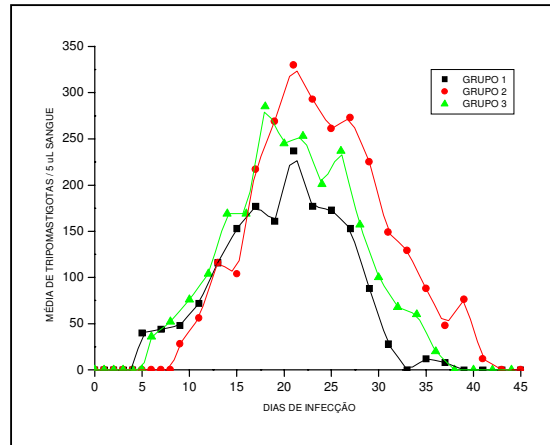
*Trypanosoma cruzi* is a flagellate protozoan agent of Chagas disease that, according to the OMS estimation, affect 16-18 million of people in Latin America, making serious social damage. The illness shows varied clinicals forms that include indeterminate form, cardiomiopathy and digestive alterations. Intra-specific variations among different *Trypanosoma cruzi* strains studied have been demonstrated on morpho-biological, genetic and biochemical levels. Such heterogeneity can explain the variability of Chagas disease in clinical manifestations and in the regional differences of the morbidity rate. This research has the objective to characterize four strains of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans patients, residents in Araraquara – SP region, by evaluating biological and molecular parameters. In order to study the biological behavior of *Trypanosoma cruzi* strains, three groups of albino Swiss mice, weighting 10-12g were intraperitoneally inoculated with bloodstream forms of the strains in study. Pre-patent period, parasitaemia patterns, tripomastigote morphology, mortality rate and tissue distribution of the protozoan were analysed. Three strains showed patent parasitemy with variable pre-patent period, low parasitemy and broad forms during the whole infection period. One strain showed sub-patent parasitemy. Mortality rates were null. Histopathological analysis showed amastigotes forms in heart for two strains and inflammatory process in several organs for all the strains. For the molecular characterization, the parasite DNA was extracted from epimastigotes forms kept in LIT medium. Part of the non-transcribed spacer of the mini-exon gene was amplified by PCR. All the strains generated products with 250 pb. The molecular and biological informations allowed to classify all the strains as *T.cruzi* II.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, Chagas disease, strain, Biodeme, PCR multiplex, *T.cruzi* II.

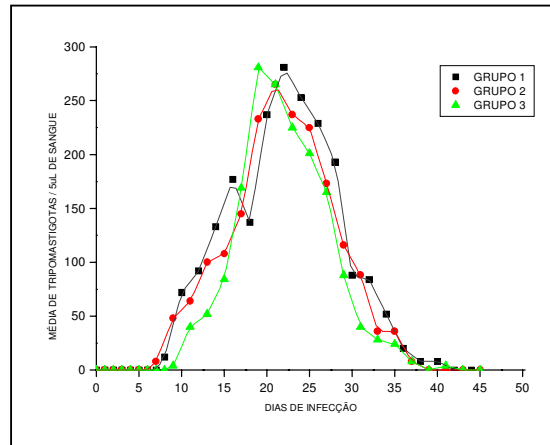
# SUMÁRIO

	<b>PÁGINA</b>
1- INTRODUÇÃO .....	12
1.1- Histórico .....	13
1.2- Morfologia e Ciclo Biológico do Parasita .....	14
1.3- Aspectos Epidemiológicos .....	17
1.4- Patogênese e Aspectos Clínicos da Doença .....	21
1.5- Tipagem de Cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	24
2- OBJETIVOS .....	33
2.1- Objetivo Geral .....	33
2.2- Objetivos Específicos .....	33
2.2.1- Caracterização biológica .....	33
2.2.2- Caracterização molecular .....	33
3- MATERIAL E MÉTODOS .....	34
3.1- Caracterização Biológica .....	34
3.1.1- Período pré-patente e curvas parasitêmicas .....	35
3.1.2- Taxa de mortalidade .....	37
3.1.3- Morfologia dos parasitas no sangue periférico .....	37
3.1.4- Estudo histopatológico .....	37
3.1.5- Classificação das cepas .....	38
3.1.6- Análise estatística dos dados .....	39
3.2- Caracterização Molecular .....	39
3.2.1- Extração do DNA .....	40
3.2.2- Reação em cadeia da polimerase (PCR) .....	40
4- RESULTADOS .....	43
4.1- Caracterização Biológica .....	43
4.1.1- Período pré-patente e curvas parasitêmicas .....	43
4.1.2- Taxa de mortalidade .....	51
4.1.3- Morfologia dos tripomastigotas sanguíneos .....	51
4.1.4- Estudo histopatológico .....	54
4.1.5- Classificação das cepas .....	61

(A)



(B)



(C)

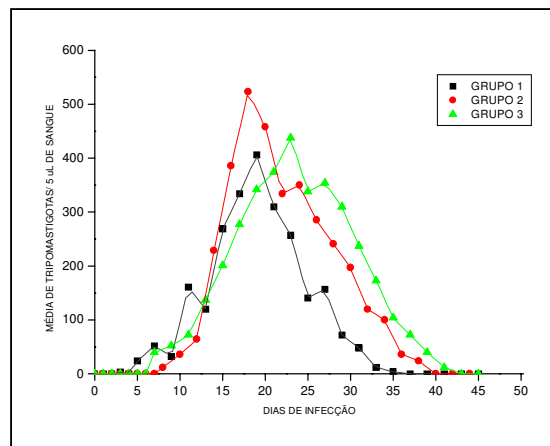
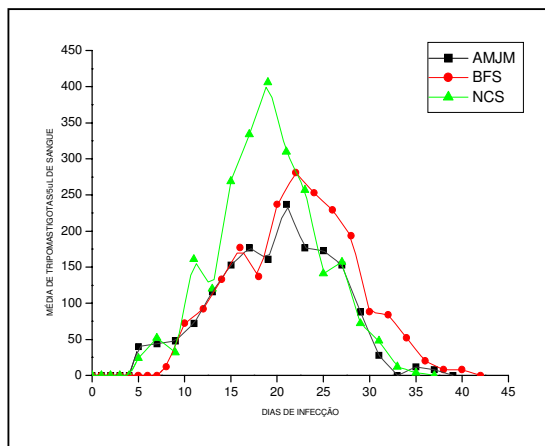
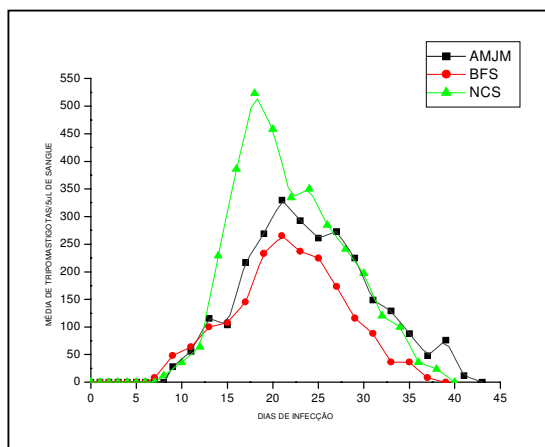


FIGURA 5- Variabilidade da parasitemia média em três diferentes grupos de camundongos *Swiss* infectados com três cepas de *Trypanosoma cruzi*. (A) = cepa AMJM; (B) = cepa BFS; (C) = cepa NCS.

(A)



(B)



(C)

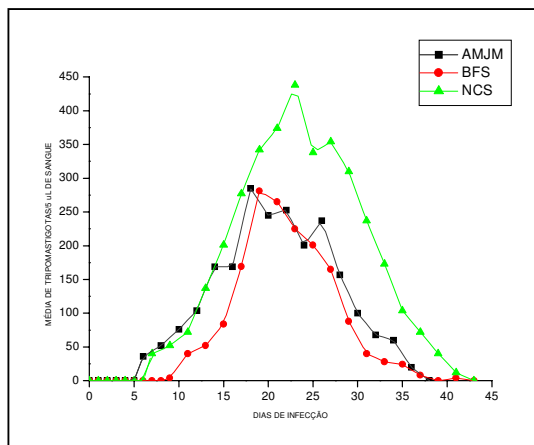


FIGURA 6- Parasitemia média em camundongos *Swiss* infectados com três diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi*, isoladas em Araraquara – SP de pacientes chagásicos crônicos. (A) = Grupo 1; (B) = Grupo 2; (C) = Grupo 3.

TABELA 1- Características biológicas de quatro cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas em Araraquara - SP de pacientes chagásicos crônicos.

Cepa	Grupo de camundongo	PPP (dias)	Pico de parasitemia			Duração da fase aguda (dias)
			nº /100 campos <sup>(1)</sup>	nº /5µL <sup>(2)</sup>	dias	
AMJM	1º	5	8	237	21	39
	2º	9	12	330	21	43
	3º	6	10	285	18	38
BFS	1º	8	10	281	22	42
	2º	7	9	265	21	39
	3º	9	10	281	19	43
NCS	1º	5	14	406	19	37
	2º	8	19	523	18	40
	3º	7	16	438	23	43
NBR	1º	ND	SP	SP	ND	ND
	2º	ND	SP	SP	ND	ND
	3º	ND	SP	SP	ND	ND

(1) média do número de formas tripomastigotas/100 campos microscópicos com aumento de 400x; (2) média do número de formas tripomastigotas/5µL de sangue de sete camundongos infectados; PPP = período pré-patente; ND = não determinado; SP = sub-patente.

#### **4.1.2- Taxa de mortalidade:**

Nenhuma cepa foi capaz de produzir mortalidade nos camundongos infectados até o 180º após a infecção.

#### **4.1.3- Morfologia dos tripomastigotas sangüíneos:**

Foram analisadas apenas as cepas AMJM, BFS e NCS uma vez que a cepa NBR apresentou parasitemia sub-patente, impossibilitando a análise morfológica das formas sangüíneas.

Em todas as cepas estudadas foram observadas apenas formas sangüíneas largas durante todo o curso da infecção. Essas formas apresentam cinetoplasto terminal, núcleo arredondado e central ( Figura 7).

Os valores médios da micrometria realizada em trinta formas tripomastigotas sangüíneas, para as cepas que apresentaram parasitemia patente, podem ser observados na Tabela 2.

Quando os valores observados na análise micrométrica foram comparados, observou-se que, para um nível de significância de 5%, foram observadas diferenças estatisticamente significativas para comprimento do flagelo, comprimento do corpo e comprimento total entre as cepas AMJM e BFS e entre as cepas AMJM e NCS. Para esses parâmetros não foram observadas diferenças entre as cepas BFS e NCS. Para os valores de largura do corpo não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as três cepas estudadas.

A caracterização das formas observadas como largas foi feita por meio da observação visual e comparação com desenhos efetuados por Brener e Chiari (1963), já que na literatura consultada não há uma definição de valores médios de comprimento e largura das formas tripomastigotas sangüíneas, que poderiam servir como base para classificação das diferentes formas em delgadas, largas ou muito largas (DIAS e FREITAS FILHO, 1943; BRENER e CHIARI, 1963; BRENER, 1969; BELDA NETO, 1973; SCHLEMPER Jr et al., 1986; De SOUSA, 1999).

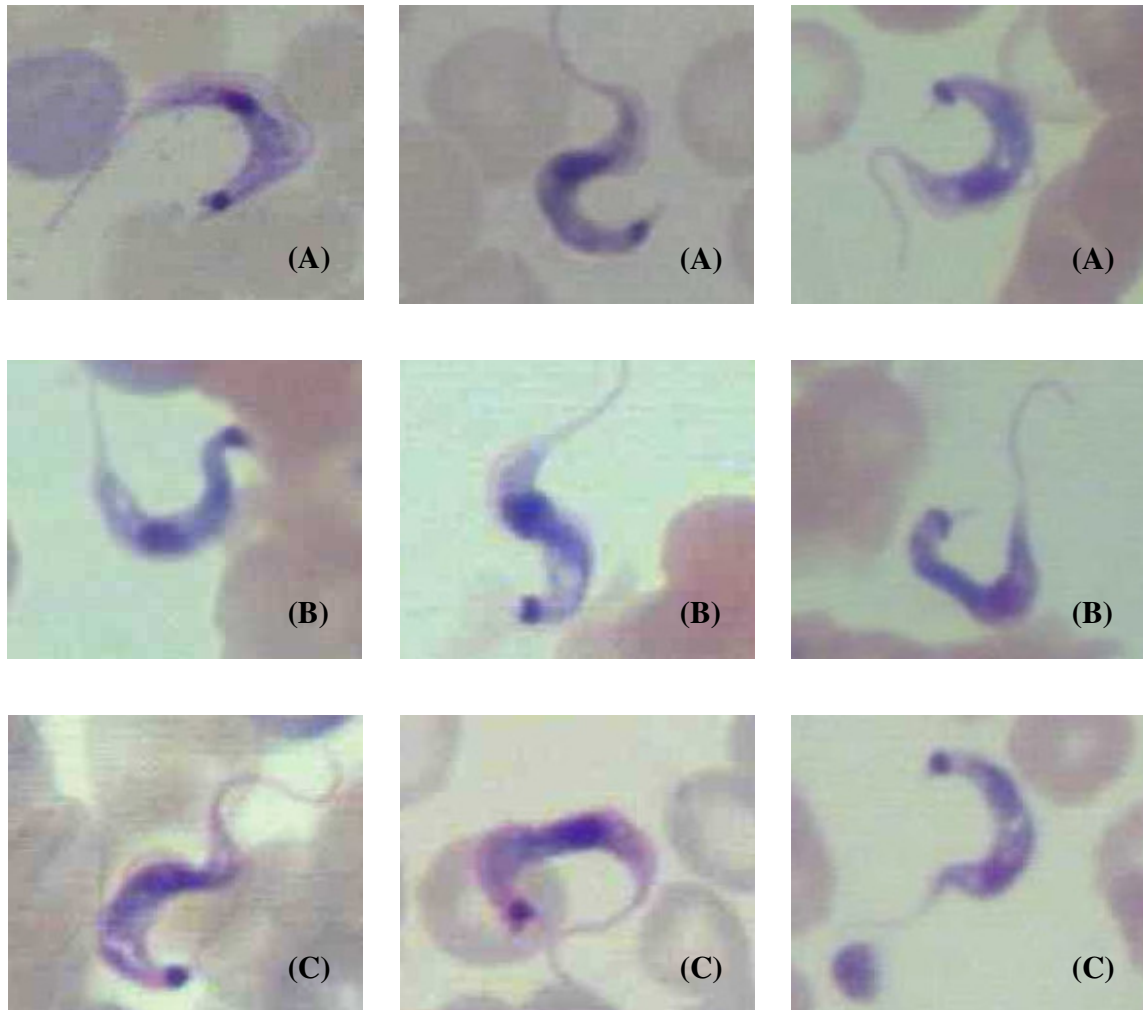


FIGURA 7- Formas tripomastigotas sangüíneas largas de *Trypanosoma cruzi* observadas no sangue periférico de camundongos Swiss infectados. (A) = cepa AMJM; (B) = cepa BFS; (C) = cepa NCS.



TABELA 2 – Valores médios da micrometria efetuada com 30 formas tripomastigotas obtidas do sangue periférico de camundongos *Swiss* infectados com três cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas em Araraquara – SP de pacientes chagásicos crônicos.

Parâmetros morfométricos (*)	CEPA		
	AMJM	BFS	NCS
comprimento do flagelo	7,24	4,48	4,46
comprimento do corpo	12,88	11,15	11,44
comprimento total	20,12	15,63	15,90
largura do corpo	2,14	2,11	2,04

(\*) valores em  $\mu\text{m}$

#### 4.1.4- Estudo histopatológico:

Parasitismo tecidual foi observado apenas em camundongos infectados pela cepa NBR na fase crônica e pela cepa AMJM na fase aguda da infecção. As formas amastigotas foram observadas no músculo cardíaco para as duas cepas citadas. Observou-se reação inflamatória, variando de discreta a moderada, no músculo cardíaco para todas as cepas estudadas. Reação inflamatória nos músculos da parede intestinal foi observada somente nos camundongos infectados com a cepa BFS. Observou-se reação inflamatória nos músculos esqueléticos dos camundongos infectados com as cepas AMJM, BFS e NCS. Reação inflamatória no fígado foi observada para as cepas AMJM e NBR. Não foram observadas reação inflamatória ou presença de parasitas no baço dos animais infectados ( Tabela 3).

- Cepa AMJM – Durante a fase aguda foram observados parasitas e reação inflamatória moderada no músculo cardíaco e reação inflamatória discreta nos músculos esqueléticos. Na fase crônica observou-se reação inflamatória discreta no músculo cardíaco e nos músculos esqueléticos e moderada no fígado ( Figura 8 ).
- Cepa BFS – Foi observada reação inflamatória discreta no músculo cardíaco e moderada nos músculos da parede intestinal, nos plexos mioentéricos e nos músculos esqueléticos durante a fase aguda da infecção e na fase crônica foi observada reação inflamatória discreta no músculo cardíaco e moderada nas células ganglionares cardíacas. Não foram observadas formas amastigotas nos tecidos analisados ( Figura 9 ).
- Cepa NBR - Observou-se reação inflamatória discreta no músculo cardíaco e nas células ganglionares cardíacas durante a fase aguda e na fase crônica foram observados parasitas no músculo cardíaco e reação inflamatória moderada no fígado (Figura 10).
- Cepa NCS – Durante a fase aguda foi observada discreta reação inflamatória no músculo cardíaco, nas células ganglionares cardíacas e nos músculos esqueléticos. Na fase crônica foi observada discreta reação

inflamatória no músculo cardíaco. Não foi observado parasitismo tecidual na fase aguda nem na fase crônica da infecção ( Figura 11 ).

TABELA 3- Achados histopatológicos em coração, músculos esqueléticos, fígado, baço e intestino de camundongos infectados com quatro cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas em Araraquara – SP de pacientes chagásicos crônicos.

Cepa	Achado histológico	Órgão									
		coração		intestino		músculo esquelético		fígado		baço	
		f.a.	f.c.	f.a.	f.c.	f.a.	f.c.	f.a.	f.c.	f.a.	f.c.
AMJM	Parasitas	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Inflamação	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-
BFS	Parasitas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Inflamação	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
NBR	Parasitas	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	Inflamação	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
NCS	Parasitas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Inflamação	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-

f.a. = fase aguda; f.c. = fase crônica; (+) = presença de parasitas ou de inflamação; (-) = ausência de parasitas ou de inflamação.

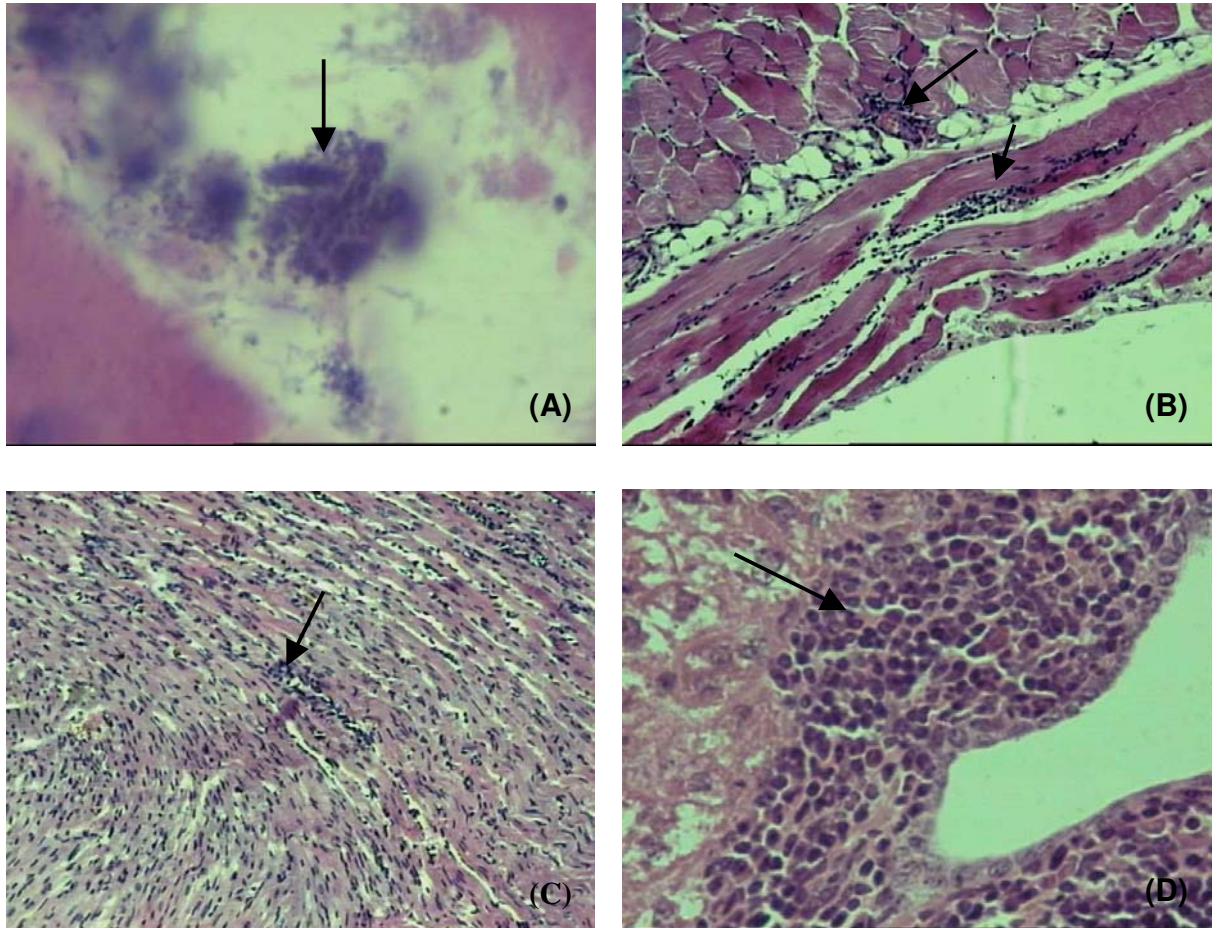


FIGURA 8 – Aspectos histológicos de órgãos de camundongos *Swiss* infectados com a cepa AMJM de *Trypanosoma cruzi*. (A) ninhos de formas amastigota ( —▶ ) no músculo cardíaco, (1000 x), fase aguda; (B) inflamação no músculo esquelético ( —▶ ) (100 x), fase aguda; (C) inflamação no músculo cardíaco ( —▶ ) (100 x), fase crônica; (D) inflamação no fígado ( —▶ ) (100 x) fase crônica. Coloração de hematoxilina-eosina.

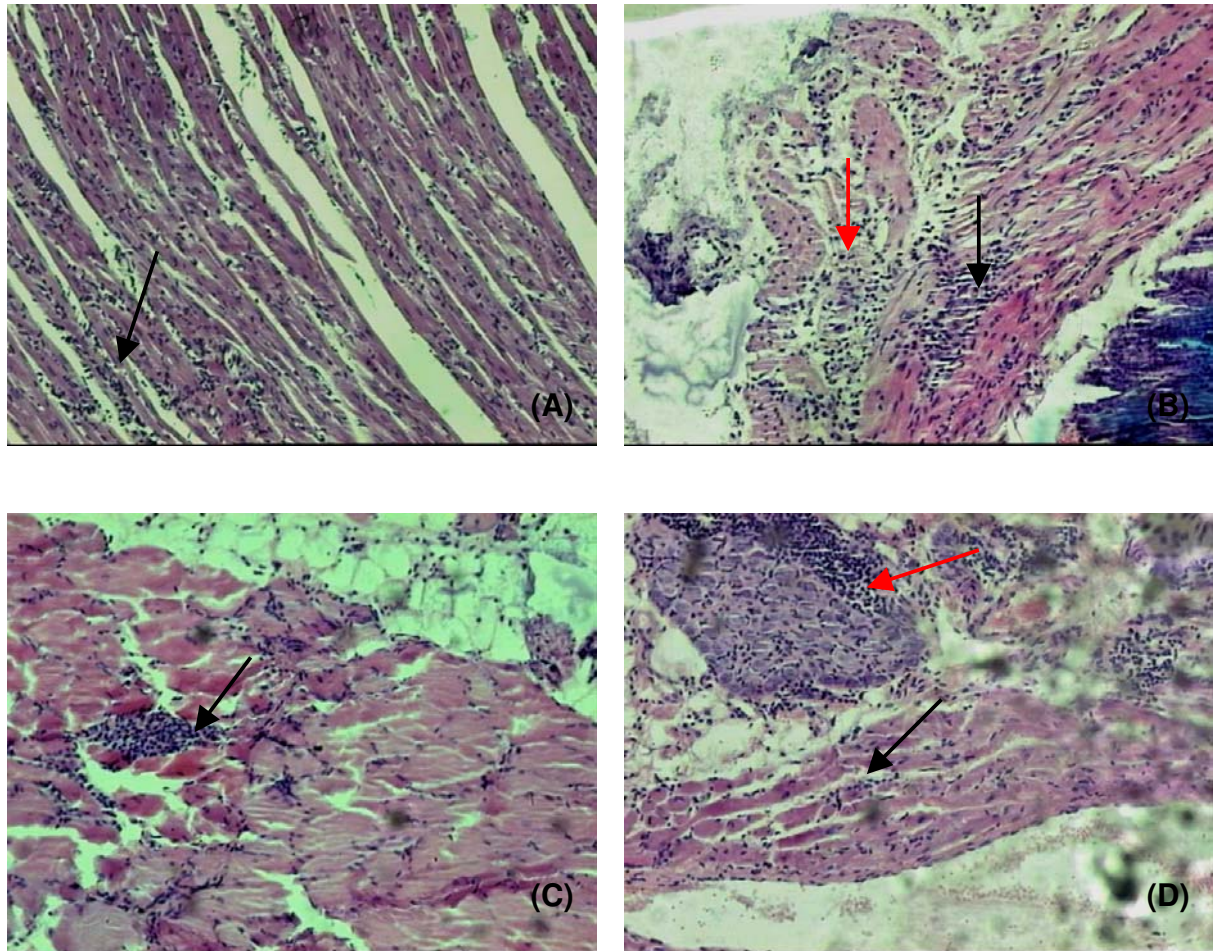


FIGURA 9 – Aspectos histológicos de órgãos de camundongos *Swiss* infectados com a cepa BFS de *Trypanosoma cruzi*. (A) inflamação no músculo cardíaco (→) (100 x), fase aguda; (B) inflamação nos músculos da parede intestinal (→) e nos plexos mioentéricos (→) (100 x), fase aguda; (C) inflamação nos músculos esqueléticos (→) (100 x), fase aguda; (D) inflamação no músculo cardíaco (→) e nas células ganglionares cardíacas (→) (100 x) fase crônica. Coloração de hematoxilina-eosina.



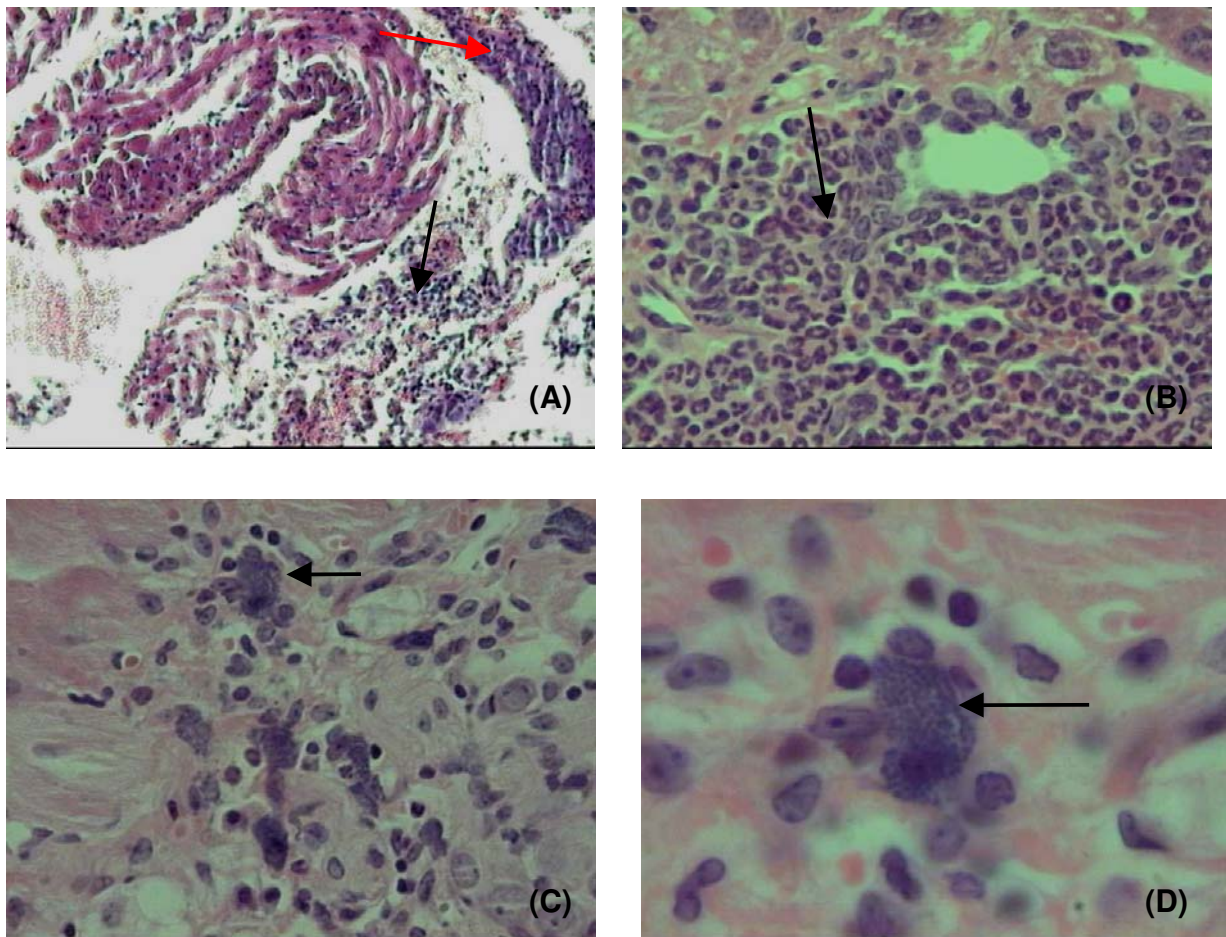


FIGURA 10 – Aspectos histológicos de órgãos de camundongos *Swiss* infectados com a cepa NBR do *Trypanosoma cruzi*. (A) inflamação no músculo ( → ) e nas células ganglionares ( → ) cardíacas (100 x), fase aguda; (B) inflamação no fígado ( → ) (400 x), fase crônica; (C) e (D) ninhos de formas amastigotas ( → ) no músculo cardíaco (400 x e 1000 x). Coloração de hematoxilina-eosina.

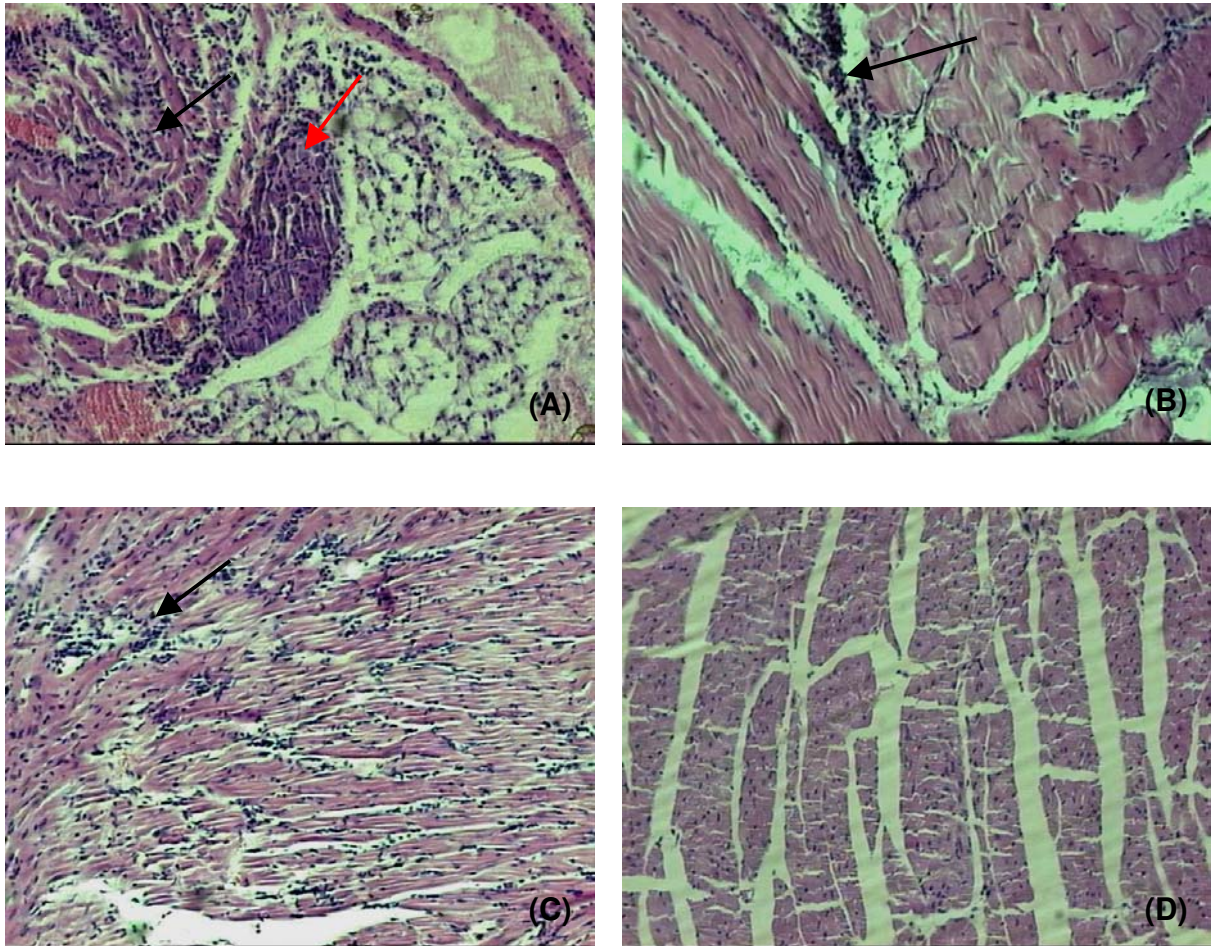


FIGURA 11 – Aspectos histológicos de órgãos de camundongos *Swiss* infectados com a cepa NCS do *Trypanosoma cruzi*. (A) inflamação no músculo (→) e células ganglionares (→) cardíacas, fase aguda; (B) inflamação nas células musculares esqueléticas (→), fase aguda; (C) inflamação nas células musculares cardíacas (→), fase crônica; (D) células musculares cardíacas normais – controle. Coloração de hematoxilina-eosina. Aumento de 100 x.



#### **4.1.5- Classificação das cepas:**

Com base nos dados obtidos:

- baixa parasitemia com picos parasitêmicos médios ocorrendo entre o 18º e 23º dias de infecção
- ausência de mortalidade dos animais infectados
- predomínio de formas tripomastigotas largas durante todo o curso da infecção
- envolvimento predominante do miocárdio

As cepas AMJM, BFS e NCS podem ser caracterizadas no Tipo ou Biodema II.

A cepa NBR apresentou parasitemia sub-patente e, segundo De Sousa (1999), cepas que não apresentam parasitemia patente não podem ser classificadas de acordo com os critérios de Andrade (1974). Mas, apesar disso, classificamos essa cepa no Tipo II baseados principalmente no miocardiotropismo, baixa parasitemia (sub-patente) e ausência de mortalidade dos animais infectados.

## 4.2- Caracterização Molecular:

As quatro cepas foram caracterizadas por meio da amplificação, pela metodologia de “PCR multiplex”, de um segmento do espaçador não-transcrito do gene de mini-exon, sendo que para todas as cepas estudadas foi amplificado um fragmento com 250 pb, correspondente a *T.cruzi* II (Figura 11).

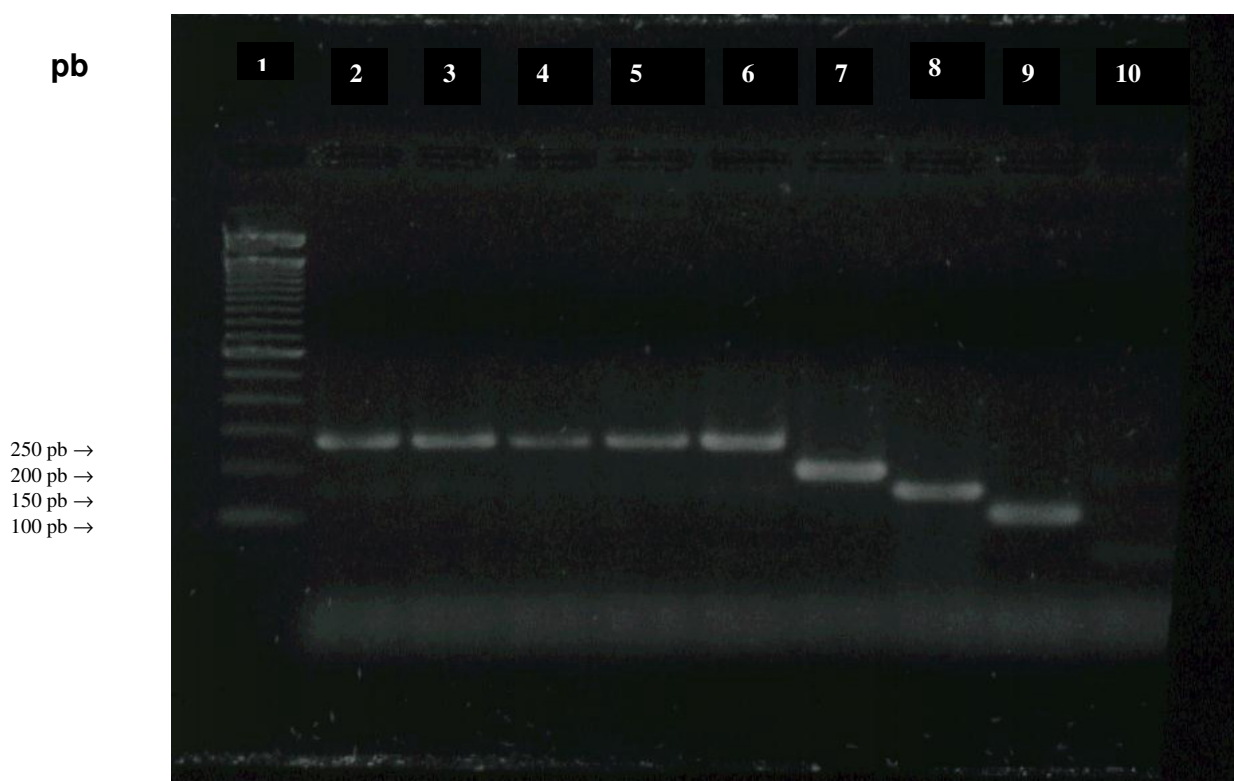


FIGURA 12 – Produto da amplificação do gene mini-exon. 1- marcador de peso molecular ladder 100 DNA<sup>®</sup>; 2- cepa AMJM; 3- cepa NBR; 4- cepa NCS; 5- cepa BFS; 6- cepa padrão *T.cruzi* II; 7- cepa padrão *T.cruzi* I; 8- cepa padrão *T.cruzi* Z3; 9- *T. rangeli*; 10- controle negativo.

### 4.3- Denominação das Cepas:

De acordo com recomendações do Satellite Meeting (1999), as cepas devem ser designadas por um código de quatro elementos, que são:

- 1- a classe do hospedeiro ou vetor do qual a cepa foi isolada, composta de quatro letras, a primeira identificando a classe à qual o hospedeiro pertence, seguida por três letras indicando o nome do gênero do hospedeiro
- 2- o país no qual foi feito o isolamento da cepa, composto por duas letras
- 3- o ano de isolamento indicado por quatro dígitos
- 4- a designação atribuída à cepa pelo laboratório onde ela foi isolada, seguida pelo grupo a que pertence a cepa.

Baseado nessas recomendações, as quatro cepas estudadas seriam assim designadas:

- MHOM/BR/1986/AMJM (*T.cruzi* II)
- MHOM/BR/1986/BFS (*T.cruzi* II)
- MHOM/BR/1986/NBR (*T.cruzi* II)
- MHOM/BR/1986/NCS (*T.cruzi* II)

## 5- DISCUSSÃO

---

*Trypanosoma cruzi* é um protozoário flagelado muito heterogêneo e sua população é caracterizada por uma morfologia diversa, um comportamento biológico heterogêneo, uma alta variabilidade genética e um curso clínico distintamente diferente (DOST et al., 2002).

Variações intra-específicas nas diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi* estudadas têm sido demonstradas em nível morfo-biológico, bioquímico e genético (ANDRADE, 1974; ANDRADE, 1985; MILES et al., 1977; MOREL et al., 1980; STEINDEL et al., 1993).

Essa heterogeneidade pode ser uma das razões que explique a variabilidade nas manifestações clínicas da doença de Chagas e as diferenças regionais de sua morbidade (DEVERA et al., 2002).

Em uma determinada área geográfica, pode estar circulando um ou vários padrões de cepas ou biodemas de *Trypanosoma cruzi*, porém, geralmente com predomínio de um deles (OLIVEIRA et al., 1993).

A presença de um mesmo padrão de cepa de *Trypanosoma cruzi* em uma mesma área endêmica pode ser de importância na explicação da ocorrência de determinados quadros clínico-patológicos da doença de Chagas, peculiares a uma determinada área geográfica (ANDRADE, 1974).

### 5.1- Caracterização Biológica:

O comportamento biológico em animais de laboratório, é um dos parâmetros usados para caracterização de diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi*.

Embora a infecção experimental em animais não reproduza fielmente a infecção humana, o camundongo tem sido amplamente usado para estudar vários aspectos da infecção. O uso comum desse animal é justificado devido a seu

pequeno tamanho, grande disponibilidade, fácil manutenção e simplicidade de manipulação (ANDRADE, 2000; ARAÚJO-JORGE, 2000).

A grande maioria das caracterizações biológicas de cepas de *Trypanosoma cruzi* têm sido conduzidas em camundongos suíços não isogênicos, já que esse animal pertence a um grupo heterogêneo e, portanto, é considerado o melhor representante das características da população humana de áreas endêmicas (DEVERA et al., 2003).

O comportamento biológico de cepas de *Trypanosoma cruzi* está baseado na sua virulência e patogenicidade.

Segundo Andrade (1974), o conceito de virulência está ligado à maior ou menor capacidade de multiplicação do parasita, que é própria para uma determinada cepa mas que pode variar dentro de certos limites, de acordo com inúmeras variáveis, podendo assim ser atenuada ou exaltada. A patogenicidade representaria a capacidade de determinar lesões tissulares que podem levar os animais à morte em diversas fases da infecção dependendo dos setores atingidos. Nesse conceito, a patogenicidade seria uma capacidade constante, enquanto a virulência, embora peculiar a cada cepa, seria flutuante. Essas duas condições em conjunto, seriam os fatores ligados ao parasita que determinariam o curso da infecção no animal experimental.

Muitos estudos de caracterização biológica demonstram que cepas de *Trypanosoma cruzi* originadas de humanos, reservatórios e vetores de distintas áreas geográficas mostram diferentes comportamentos no animal experimental (BADINEZ 1945; DEANE et al., 1963; ANDRADE e MAGALHÃES, 1997).

Esse fenômeno é influenciado por fatores ambientais e imunológicos, virulência, patogenicidade e possíveis seleção de cepas e clones depois da interação com vetores e hospedeiros vertebrados. A combinação de vários desses fatores pode explicar a variabilidade do comportamento biológico do parasita (BICE e ZELEDÓN, 1970; MAGALHÃES et al., 1996).

### 5.1.1- Evolução da parasitemia:

A primeira referência de que amostras de *Trypanosoma cruzi* de diferentes procedências, poderiam se comportar de maneira diversa, foi feita por Brumpt em 1913, quando estudando uma amostra isolada por Chagas e outra procedente da Bahia, verificou que a primeira apresentava uma virulência exaltada enquanto a segunda tinha baixa virulência, determinando infecção não letal em cobaias (ANDRADE, 1974).

Zuccarini em 1930, verificou uma diminuição da virulência das amostras estudadas, com as passagens em animal, encurtamento do período pré-patente com as passagens em série, observando que os animais recém nascidos morriam precocemente em relação aos adultos, e mostrando parasitismo miocárdico com as diversas amostras (ANDRADE, 1974).

Nesse estudo, as cepas AMJM, BFS e NCS apresentaram parasitemia patente, enquanto a cepa NBR apresentou parasitemia sub-patente.

O períodos pré-patentes observados para as cepas em estudo que apresentaram parasitemia patente foram variáveis, oscilando de 5 a 9 dias para a cepa AMJM, 7 a 9 dias para a cepa BFS e 5 a 8 dias para a cepa NCS (Tabela 1).

Devera et al. (2002) observaram períodos pré-patentes mais curtos para cepas de elevada parasitemia e maiores para cepas de baixa parasitemia. Entretanto, Martins et al. (2003) observaram período pré-patente de quatro dias para a cepa FAMEMA, que apresenta baixa parasitemia.

A relação entre duração do período pré-patente e os níveis de parasitemia não pôde ser observada em um estudo realizado por Belda Neto em 1973. Ele observou duas cepas que, apesar de apresentarem períodos pré-patentes idênticos, apresentaram graus de parasitemia distintos.

Nas três cepas que apresentaram parasitemia patente, a multiplicação foi relativamente lenta com baixa parasitemia (Figuras 2, 3 e 4). A cepa AMJM apresentou picos parasitêmicos médios variando de 237 a 330 formas parasitárias/5  $\mu$ L de sangue; a cepa BFS apresentou picos parasitêmicos médios oscilando entre 265 e 281 formas tripomastigotas/5  $\mu$ L de sangue e para a cepa NCS os picos parasitêmicos médios variaram de 406 a 523 formas sangüíneas/5  $\mu$ L de sangue. Esses picos parasitêmicos ocorreram entre o 18<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> dias após a infecção para a

cepa AMJM, 19<sup>o</sup> e 22<sup>o</sup> dias de infecção para a cepa BFS e 18<sup>o</sup> e 23<sup>o</sup> dias de infecção para a cepa NCS (Tabela 1).

Cepas de *Trypanosoma cruzi* de alta, média e baixa virulências, bem como cepas que não apresentam parasitemia patente em camundongos tem sido isoladas por vários pesquisadores de pacientes chagásicos crônicos, de reservatórios silvestres e de vetores (SCHLEMPER Jr et al., 1983; CARNEIRO et al., 1991; STEINDEL et al., 1993). Em pacientes chagásicos crônicos há uma predominância de cepas de *Trypanosoma cruzi* de baixa virulência para camundongos (FERNANDES et al., 1997)

Em um estudo prévio realizado por Rosa et al. (1987), foi determinada a curva parasitêmica dessas cepas: a cepa AMJM apresentou pico da parasitemia no 17<sup>o</sup> dia de infecção com média de 10 formas tripomastigotas/100 campos; a cepa BFS apresentou pico da parasitemia no 10<sup>o</sup> dia de infecção com média de 5 formas parasitárias/100 campos; o pico da parasitemia para a cepa NBR ocorreu no 18<sup>o</sup> dia de infecção com média de 6 formas parasitárias/100 campos e para a cepa NCS o pico da parasitemia ocorreu no 17<sup>o</sup> dia de infecção com média de 35 parasitas/100 campos.

Quando comparamos os dados referentes ao número de parasitas por 100 campos microscópicos observados em nosso estudo, 8 a 12 formas parasitárias para a cepa AMJM, 9 a 10 formas tripomastigotas para a cepa BFS, 14 a 19 formas parasitárias para a cepa NCS e ausência de parasitemia patente para a cepa NBR (Tabela 1), observamos que houve diminuição da parasitemia para as cepas NCS e NBR, aumento da parasitemia para a cepa BFS e manutenção dos níveis parasitêmicos para a cepa AMJM.

Transformações no comportamento biológico das cepas de *Trypanosoma cruzi* podem ocorrer durante a realização de repiques sucessivos em camundongos, onde as condições de manutenção do laboratório agiriam como meio selecionador (CARNEIRO et al., 1991). Essas mudanças foram descritas por vários autores e o aspecto mais freqüentemente observado foi o aumento da virulência (BRENER e CHIARI, 1963; BRENER et al., 1974; CAMANDARоба et al, 2001).

A cepa Y, no início de seu isolamento apresentava baixa virulência para camundongos e, após dois anos de repiques sucessivos para manutenção teve sua virulência acentuada (SILVA e NUSSENZWEIG, 1953).

Pinto et al. (1999) observaram que após quarenta anos de passagens por camundongos, a cepa Y apresentou uma alteração no seu comportamento com desaparecimento precoce dos parasitas da circulação e ausência de ninhos de amastigotas nos tecidos. Os autores questionam se estaria havendo uma perda de virulência ou uma mutação da cepa Y. Essa cepa, isolada em 1950, apresentava um ciclo de vida constante e estável e produzia resultados hematológicos e histopatológicos padronizados, tornando-se ideal para estudos experimentais.

Atenuação da virulência foi observado por Andrade (1974) estudando dezesseis amostras isoladas de uma mesma área endêmica. Observou ainda que, em uma mesma passagem, animais que receberam inóculos idênticos também apresentaram variabilidade da parasitemia.

Martins et al. (2003) observaram diminuição da parasitemia da cepa FAMEMA, isolada na região de Marília – SP, após três anos de repiques sucessivos em camundongos.

Preservação da parasitemia foi observado por Campos e Andrade (1996) em clones e subclones da cepa 21SF após manutenção em laboratório por quinze anos.

Phillips (1960) estudando as cepas WBH e Y observou que, após passagens sucessivas do parasita com inóculos cada vez menos ricos, havia uma deterioração da virulência. Por isso, estudamos o comportamento das cepas em três grupos de camundongos utilizando um inóculo padronizado, já que essas cepas vinham sendo mantidas há mais de dezesseis anos por repiques não padronizados em camundongos.

Em nosso estudo, o comportamento das três cepas que apresentaram parasitemia patente, AMJM, BFS e NCS, permaneceu aproximadamente constante nos três grupos de camundongos infectados (Figura 5), sugerindo que pode ter havido uma seleção das formas melhor adaptadas ao hospedeiro vertebrado. Esse mesmo comportamento foi observado por Carneiro et al. (1991) ao estudar treze cepas de *Trypanosoma cruzi* após dezoito meses de manutenção em camundongos.

A importância das condições de manutenção em laboratório como um fator de seleção de cepas de *Trypanosoma cruzi* em camundongos submetidos a dupla infecção foi demonstrada por Deane et al. (1984).

Estudos em populações clonadas demonstraram que cepas de *Trypanosoma cruzi* consistem de distintas sub-populações as quais são ou não expressas



dependendo das condições de manutenção (MOREL et al., 1980; ARAÚJO e CHIARI, 1988; DVORAK et al., 1989).

Brener et al. (1974) inocularam três diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi* em camundongos das linhagens DBA/2 e C57BL/6 que são mais resistentes à infecção e observaram que, apesar do menor número de parasitas observados nesses animais, o padrão da infecção foi similar ao observado em camundongos albinos suscetíveis. Isso sugere que, embora possa ser influenciada pela espécie de hospedeiro, a parasitemia é marcadamente dependente de peculiaridades da cepa do parasita.

A cepa NBR apresentou parasitemia sub-patente nas três passagens por camundongos. No estudo prévio, essa cepa apresentava parasitemia baixa, mas patente. A diminuição da parasitemia pode estar relacionada com o pequeno inóculo, já que Andrade (1974) observou que a virulência tinha uma correlação direta com a idade dos animais infectados e com o número de parasitas inoculados. A autora observou que os níveis parasitêmicos foram mais elevados e com picos mais precoces quando os inóculos eram muito elevados. Já Brener e Chiari (1963) não observaram relação entre o número de tripomastigotas metacíclicos inoculados e os níveis iniciais de parasitemia. Em algumas ocasiões, após a inoculação de um grande número de formas infectantes o exame do sangue a fresco foi repetidamente negativo.

Parasitemia sub-patente foi observada por Lima et al. (1999) em todos os camundongos infectados pela cepa G-327 e cinco clones derivados da mesma cepa.

Carneiro et al. (1991), estudando treze cepas isoladas de pacientes chagásicos crônicos, utilizando um inóculo padronizado, verificaram que quatro cepas apresentavam parasitemia sub-patente, sendo que após oito passagens por camundongos uma tornou-se patente e três continuaram sub-patente mesmo após serem inoculadas em camundongos irradiados com radiação gama.

Phillips (1960) procurou correlacionar quantitativamente o inóculo com a patogenicidade. Verificou que em duas cepas, WBH e Y o curso da infecção e da mortalidade dependeram diretamente do aumento do número de parasitas no sangue circulante. Estudando, entretanto a cepa Sonya verificou que a patogenicidade não dependia diretamente do inóculo, sendo a infecção sempre de curso prolongado e sempre fatal. Concluiu que devem existir pelo menos duas formas de infecção por *Trypanosoma cruzi* a serem consideradas: em uma a

intensidade da infecção está positivamente correlacionada com o número de parasitas inoculados, enquanto que a outra depende da multiplicação e das lesões tissulares que determinam, independentemente do inóculo.

Hauschka (1949) estudou a estabilidade de comportamento das cepas Brasil e WBH para o animal experimental em um período de dois anos de observação. Para esse estudo procurou eliminar ao máximo as variáveis que poderiam influenciar o comportamento das cepas, utilizando animais geneticamente homogêneos, do mesmo sexo, com dieta padronizada, infectados em intervalos regulares com inóculos uniformes e concluiu que as diferenças de virulência observadas entre os dois grupos foram estáveis e atribuíveis a um padrão fisiológico específico a cada cepa do parasita. Cada uma manteve o seu próprio máximo de virulência quando mantida em condições ótimas, em passagens sucessivas.

### **5.1.2- Morfologia das formas sangüíneas:**

A variabilidade morfológica das formas sangüíneas de *Trypanosoma cruzi* foi observada por Carlos Chagas em 1909 quando ele, ao descrever a doença, observou formas delgadas e largas do parasita. Além dessas, outros tipos, como pequenas, muito largas ou intermediárias podem também ser observadas (De SOUSA, 1999).

Carlos Chagas considerou o dimorfismo das formas sangüíneas observado por ele, como sendo a expressão de uma diferenciação sexual. Esse ponto de vista não é aceito pela maioria dos autores (BRENER e CHIARI, 1963).

Diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi* mostram em camundongos experimentalmente inoculados, uma predominância relativa de diferentes formas tripomastigotas sangüíneas: delgadas, largas ou muito largas (BRENER E CHIARI, 1963; BRENER et al., 1974; ANDRADE, 1974).

De acordo com Brener (1969), formas delgadas aparecem na fase inicial da infecção enquanto formas largas e muito largas aumentam gradualmente durante o curso da infecção.

Em nosso estudo, nas cepas que apresentaram parasitemia patente foram observadas apenas formas largas durante todo o curso da infecção (Figura 7). Essas

formas apresentaram valores médios de 20,12  $\mu\text{m}$  de comprimento e 2,13  $\mu\text{m}$  de largura para a cepa AMJM, 15,63  $\mu\text{m}$  de comprimento e 2,11  $\mu\text{m}$  de largura para a cepa BFS e 15,90  $\mu\text{m}$  de comprimento e 2,04  $\mu\text{m}$  de largura para a cepa NCS (Tabela 2).

Esses resultados estão de acordo com os dados obtidos por Andrade (1974) que observou que formas delgadas predominam em cepas altamente virulentas e macrofagotrópicas, enquanto formas largas predominam em cepas menos virulentas e miotrópicas.

Tripomastigotas sangüíneos dos tipos intermediários e largos tem predominado na maioria das cepas isoladas de humanos, triatomíneos e mamíferos silvestres (BRENER E CHIARI, 1963; ANDRADE, 1974).

Para Meyer e Oliveira (1948) o rompimento precoce das células parasitadas libertaria formas delgadas, ao passo que o prolongamento da permanência dos parasitas nas células daria origem a formas largas.

De acordo com Andrade (1974), uma multiplicação rápida e precoce sempre coincide com a presença de formas delgadas e isto corresponde a um parasitismo das células do sistema mononuclear fagocitário. Provocando-se uma maior multiplicação parasitária em cepas como a Colombiana, que apresenta predominância de formas largas durante todo o curso da infecção, pelo uso de corticóide ou pela reativação por passagens em camundongos recém-nascidos, observam-se picos precoces de parasitemia que coincidem com o aparecimento de formas delgadas e de discreto reticulotropismo.

Segundo Brener (1969), quando amostras de sangue com formas largas e delgadas de *Trypanosoma cruzi* são inoculadas intravenosamente em camundongos, as formas delgadas desaparecem rapidamente da circulação, provavelmente devido ao desenvolvimento intracelular, enquanto que as formas largas permanecem na circulação por alguns dias. Formas delgadas são aparentemente melhor equipadas para penetrar em células. Formas largas são aparentemente mais resistentes aos mecanismos imunológicos do hospedeiro. Quando injetadas intravenosamente em camundongos na fase crônica, formas largas persistem na circulação por muitos dias, enquanto formas delgadas desaparecem dentro de uma a duas horas.

As formas largas são também melhor adaptadas para desenvolvimento em triatomíneos ou em culturas axênicas (De SOUSA, 1999).

Vários autores observaram predomínio de formas delgadas nas cepas que apresentavam alta ou média virulências e predomínio de formas largas nas cepas de baixa virulência (ANDRADE, 1974; DEVERA et al., 2002; MARTINS et al, 2003). Entretanto, Belda Neto (1973) não observou correlação entre a predominância de uma determinada forma morfológica e a agressividade das amostras estudadas por ele. Amostras que apresentavam predominância de formas delgadas mostraram-se tão patogênicas para camundongos quanto uma amostra que exibiu grande quantidade de formas mais largas.

Carneiro et al. (1991) observaram um predomínio de formas largas durante a infecção com cepas de média virulência. Cepas de alta virulência apresentaram inicialmente formas delgadas e depois formas muito largas. Todas as formas apresentaram tropismo preferencial para músculos cardíacos e esqueléticos.

### **5.1.3- Taxa de mortalidade:**

Neste estudo, nenhuma cepa foi capaz de causar a morte em nenhum camundongo infectado durante o período de estudo.

Essa observação está de acordo com Andrade (1974) que relatou que a mortalidade nos diversos grupos estudados por ela variou paralelamente com os índices parasitêmicos, sendo muito elevadas nas amostras com altas parasitemias e nula nas amostras que cursaram com parasitemias muito baixas.

Carneiro et al. (1991) observaram mortalidade apenas em animais infectados com cepas de alta parasitemia.

Camandaroba et al. (2001) observaram alta mortalidade em animais infectados com cepas de alta parasitemia e baixa mortalidade em animais infectados com cepas de média parasitemia.

Martins et al. (2003) estudando uma cepa de baixa virulência não observaram morte dos camundongos.

#### 5.1.4. Lesões histopatológicas:

Foram examinados cortes de tecidos de vários animais infectados e sacrificados nas fases aguda e crônica da infecção.

Formas parasitárias foram observadas no músculo cardíaco de animais infectados com as cepas AMJM na fase aguda e NBR na fase crônica da infecção. Reação inflamatória foi observada no músculo cardíaco de animais infectados com todas as cepas estudadas, nos músculos da parede intestinal para a cepa BFS, nos músculos esqueléticos para as cepas AMJM, BFS e NCS e no fígado para as cepas AMJM e NBR (Tabela 3 e Figuras 8, 9, 10 e 11).

Em camundongos infectados com a cepa NBR, apesar do pequeno inóculo e de não apresentar parasitemia patente nos três grupos estudados, foram observados parasitas no músculo cardíaco. Essa observação está de acordo com Andrade (1974 e 1985), que relata que a patogenicidade é uma característica constante e independe do inóculo.

Petana e Coura (1974) observaram que camundongos infectados com um pequeno número de parasitas e outros infectados com um inóculo dez vezes maior apresentaram lesões semelhantes no coração e no intestino.

Schlemper Jr et al. (1983) observaram que a presença de parasitismo tecidual na fase crônica estava diretamente relacionada com a virulência exibida pela cepa na fase aguda da infecção, exceto para uma cepa que, apesar da baixa virulência, induziu parasitismo tecidual em 46% dos animais infectados.

Devera et al. (2002), estudando 14 cepas isoladas de humanos observaram parasitismo tecidual em todos os camundongos infectados com cepas de alta e média parasitemia, enquanto apenas uma cepa de baixa parasitemia induziu o aparecimento de parasitas em vários órgãos.

Martins et al. (2003), estudando uma cepa de baixa parasitemia, observaram ninhos de amastigotas e inflamação, principalmente no coração dos camundongos infectados.

Andrade (1990), estudando 201 camundongos infectados com cepas dos três biotipos, observou que há uma clara influência do tipo biológico da cepa nas lesões histopatológicas detectadas. Cepas do Tipo III são mais patogênicas, determinando lesões intensas em músculos cardíacos e esqueléticos, com

parasitemia patente nos tecidos mesmo em uma fase tardia da infecção. Lesões cardíacas na fase crônica foram observadas também em camundongos infectados com cepas Tipo I e Tipo II, assim como um envolvimento significativo de células neuronais do plexo mioentérico.

### **5.1.5- Classificação das cepas:**

A classificação das cepas é feita segundo os critérios estabelecidos por Andrade (1974), tendo como parâmetros os índices de parasitemia, morfologia das formas tripomastigotas sangüíneas, taxa de mortalidade dos animais infectados, tropismo tissular. Analisando esses parâmetros, todas as quatro cepas estudadas puderam ser classificadas no Tipo II.

Esses dados estão de acordo com Andrade e Magalhães (1997), que observaram um predomínio de cepas do Tipo II no Brasil. Essas cepas estão associadas com o ciclo doméstico do parasita. Cepas do Tipo I são raramente observadas no Brasil, sendo representadas pela cepa Y e pela cepa SC-44, isolada de um gambá em Santa Catarina. Cepas do Tipo I foram isoladas nos Estados de São Paulo, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Cepas do Tipo III estão associadas com o ciclo silvestre do parasita, tendo sido também observadas em pacientes humanos das regiões norte e nordeste do Brasil.

Sabendo-se que o número de formas tripomastigotas inoculadas no animal experimental pode interferir com os níveis de parasitemia (ANDRADE, 1974), é necessário que se estabeleçam inóculos padrões para determinação dos níveis de parasitemia.

Na literatura consultada, os diversos parâmetros biológicos de diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi* foram determinados utilizando-se de inóculos que variaram de 50 a 150.000 formas parasitárias (BRENER et al., 1974; SCHLEMPER Jr et al., 1983; CARNEIRO et al., 1991; CAMPOS E ANDRADE, 1996; FERNANDES et al., 1997; PINTO et al., 1999; CAMANDAROBA et al., 2001; DEVERA et al., 2002; GOMES et al., 2003; MARTINS et al., 2003).

É necessário também uniformizar os critérios de virulência e patogenicidade. Diferentes autores utilizam índices de parasitemia médios bastante variáveis para classificação dos níveis baixo, médio e altos de virulência.

Assim, Andrade (1974) classifica as diferentes cepas em níveis parasitêmicos baixos, médios e elevados, sem contudo definir um valor médio de parasitemia para cada um desses níveis.

Schlemper Jr et al. (1983) classificaram cepas de baixa virulência as que apresentaram picos parasitêmicos de  $10^5$  parasitas/ mL, cepas de virulência média quando os níveis médios de parasitemia foram de  $6 \times 10^5$  parasitas/ mL, cepas de alta virulência quando apresentaram picos parasitêmicos médios de 2 a  $3 \times 10^6$  parasitas/ mL.

Carneiro et al. (1991), classificam as diferentes cepas estudadas, de acordo com a virulência em três grupos: a) cepas com alta virulência são aquelas que causam 100% de mortalidade nos animais infectados e predomínio de formas muito largas na fase final da infecção; b) cepas com média virulência são as que não causaram mortalidade nos animais infectados e predomínio de formas largas na fase final da infecção e c) cepas com baixa virulência foram as que não causaram mortalidade e as formas sangüíneas não foram determinadas devido à parasitemia sub-patente.

Para Fernandes et al. (1997), cepas de alta virulência alcançaram picos parasitêmicos de  $13,1 \times 10^3$  parasitas/5  $\mu$ L de sangue e cepas de baixa virulência apresentaram picos parasitêmicos de 900 parasitas/5  $\mu$ L de sangue.

Camandaroba et al. (2001) consideram cepas com alta parasitemia quando o pico parasitêmico é maior do que 500 formas tripomastigotas/50 campos microscópicos com aumento de 400 vezes e cepas com parasitemia média quando os picos estão entre 100 e 500 formas parasitárias/50 campos microscópicos.

Devera et al. (2002) classificam cepas de elevada parasitemia aquelas que apresentam picos médios maiores de 1500 parasitas/ 5 $\mu$ L de sangue; média parasitemia quando os picos estão entre 500 e 1499 parasitas/ 5 $\mu$ L de sangue e baixa parasitemia quando os picos são inferiores a 500 formas parasitárias/ 5 $\mu$ L de sangue.

Gomes et al. (2003) classificam cepas de baixa parasitemia aquelas que apresentam parasitemia sub-patente ou patente até  $10^3$  parasitas/mL de sangue,

média parasitemia quando os picos parasitêmicos variam de  $10^4$  a  $10^5$  parasitas/mL de sangue e alta parasitemia quando os picos são maiores de  $10^6$  parasitas/mL de sangue.

Pelo exposto observa-se a necessidade de se estabelecer valores médios de parasitemia nos picos parasitêmicos, que sirvam como base para classificação das diferentes cepas de acordo com o grau de virulência.

A demonstração de que uma alta porcentagem de cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas de pacientes humanos são de baixa virulência em condições experimentais, indicam que deveria ser dada maior atenção a essas populações, as quais são freqüentemente negligenciadas devido à dificuldade de adaptação ao modelo animal. Há outras evidências de que essas cepas são mais representativas do *pool* de populações de *Trypanosoma cruzi* que circulam na natureza (SCHLEMPER Jr et al., 1983). O uso de cepas de alta virulência pode ter distorcido conceitos da doença de Chagas experimental (CARNEIRO et. al., 1991).

## 5.2- Caracterização Molecular:

A transmissão vetorial de *Trypanosoma cruzi* para humanos tem sido atribuída, tradicionalmente, a dois ciclos conectados que são bem definidos: os ciclos silvestre e doméstico. A infecção humana através do ciclo doméstico é o resultado da domiciliação de vetores que trazem o parasita do ambiente silvestre para as habitações humanas. A presença ocasional de mamíferos e triatomíneos silvestres nas habitações humanas também representa uma fonte de transmissão do parasita. Além disso, a infecção humana pode ser adquirida via ciclo silvestre quando o homem invade esse ambiente (FERNANDES et al., 1999).

Miles et al. (1977, 1978, 1980) descreveram três distintos zimodemas de *Trypanosoma cruzi*, os quais estão correlacionados com os ciclos de transmissão: zimodemas 1 e 3 relacionados com o ciclo silvestre e zimodema 2 relacionado com o ciclo doméstico.

Em contraste à grande variabilidade fenotípica, marcadores genéticos tem revelado duas principais linhagens de *Trypanosoma cruzi*. Amplificação por PCR de uma seqüência do domínio divergente D7 do gene que codifica a 24S $\alpha$  rRNA indica



dimorfismo entre isolados de *Trypanosoma cruzi* (SOUTO e ZINGALES, 1993). Essas observações foram confirmadas por ribotipagem (CLARK e PUNG, 1994). Subseqüentemente, estudos envolvendo análise do RAPD e amplificação por PCR do gene de mini-exon corroboraram a existência de duas linhagens, designadas linhagens 1 e 2 (SOUTO et al., 1996). Tem sido notada uma associação preferencial da linhagem 1 com o ciclo doméstico e da linhagem 2 com o ciclo silvestre do parasita. As linhagens parecem estar correlacionadas com os zimodemas 2 e 1 respectivamente.

A posição do zimodema 3 foi investigada baseado na análise de seqüências do gene de mini-exon e concluiu-se que constitui uma discreta sub-linhagem dentro da linhagem 2 (FERNANDES et al., 1998).

As cepas caracterizadas na linhagem 1 foram denominadas *T.cruzi* II e as cepas caracterizadas na linhagem 2 foram denominadas *T.cruzi* I. (SATELLITE MEETING, 1999).

Isolados da região Amazônica que não puderam ser classificados dentro das linhagens 1 ou 2, tiveram o gene de mini-exon clonado e seqüenciado. Todos os clones tinham uma inserção similar no espaçador não transcrito desse gene. Dois isolados que tinham sido previamente caracterizados fenotipicamente no zimodema 3 por análise de isoenzimas, também mostraram a mesma inserção no gene de mini-exon (FERNANDES et al., 2001).

A existência de uma terceira linhagem foi recentemente proposta por Robello et al. (2000), analisando seqüências de DNA de diferentes isolados de *Trypanosoma cruzi*. Esses dados foram corroborados por Machado e Ayala (2001) e Augusto-Pinto et al. (2003).

Neste estudo, utilizando "PCR multiplex", para todas as amostras foi amplificado um fragmento de 250 pb (Figura 12) sendo então as mesmas classificadas como *T.cruzi* II, que corresponde à linhagem 1 e está relacionada ao ciclo doméstico do parasita. Isso já era esperado uma vez que essas amostras foram isoladas de pacientes humanos e, sabe-se que, embora *T.cruzi* I e *T.cruzi* II possam causar doença em humanos (BRISSE et al., 1998), *T.cruzi* II é altamente prevalente em infecções humanas no Brasil (ZINGALES et al., 1998). A maioria das cepas isoladas de pacientes humanos tem sido classificadas nesse grupo (SOUTO et al., 1996; ZINGALES et al., 1998; FERNANDES et al., 1999 a).

Em países como México e Colômbia, onde a doença de Chagas é endêmica, tem se observado o predomínio de *T. cruzi* I.

Bosseno et al. (2000) caracterizaram quatorze cepas isoladas de pacientes humanos do México e observaram que todas as amostras pertenciam a *T. cruzi* I.

Cuervo et al. (2002) estudaram quatorze amostras Colombianas, isoladas de diversos hospedeiros e de diversas áreas geográficas e caracterizaram dez amostras como *T. cruzi* I e concluíram que essa pode ser a razão para o alto grau de pacientes com doença de Chagas assintomática, já que *T. cruzi* I está associado com baixa morbidade no Brasil.

Marin (2003) estudando vinte e nove isolados de pacientes chagásicos Colombianos, observou que 86,2% das cepas foram classificadas como *T. cruzi* I.

Zingales et al. (1998) observaram que cepas da linhagem 1 circulam preferencialmente no ciclo doméstico, enquanto que no ciclo silvestre cepas de ambas as linhagens circulam igualmente. Em algumas áreas endêmicas do Brasil existe uma ligação entre os dois ciclos mediada por cepas da linhagem 1. Em regiões como Minas Gerais, Paraíba e Piauí, humanos são infectados por cepas da linhagem 1 por meio de triatomíneos domiciliados e este é um fator predisponente para o aparecimento da doença de Chagas. Na região Amazônica, humanos interagem com o parasita que está circulando em um ciclo silvestre homogêneo entre triatomíneos silvestres. Nessa região, onde quase todos os parasitas isolados de triatomíneos e de humanos foram tipados como pertencentes à linhagem 2, as manifestações clínicas da doença de Chagas raramente ocorrem.

De acordo com Zingales et al. (1998), uma hipótese que explicaria que características de cepas da linhagem 1 permitiria que fosse feita a ligação entre os ciclos domésticos e silvestres é que existe uma associação preferencial desta linhagem a espécies de triatomíneos adaptadas aos ambientes domésticos e peri-domésticos. Uma outra possibilidade é que cepas da linhagem 1 tenham propriedades que favoreçam a infecção humana. Existem evidências que cepas desse grupo apresentam uma parasitemia mais alta em humanos.

Também tem sido relatado que cepas da linhagem 1 são mais infectivas para células HeLa do que cepas da linhagem 2. Esses resultados foram correlacionados com a expressão da glicoproteína gp90, que inibe a mobilização do cálcio requerida para a invasão celular e está presente em cepas da linhagem 2, mas não em cepas da linhagem 1 (RUIZ et al., 1998).

Briones et al. (1999) sugerem que as duas linhagens de *Trypanosoma cruzi* são, provavelmente, duas espécies diferentes que evoluíram independentemente por um longo período de tempo e tem atributos epidemiológicos e ecológicos distintos. Os ciclos silvestres e humanos da tripanossomíase americana poderiam ser consequência da diversidade genética do parasita, assim como de adaptações genéticas e imunológicas do hospedeiro.

Assim, a divisão de *Trypanosoma cruzi* em dois grupos principais é evidente não somente genotípicamente mas, também, fisiologicamente. Para Zingales et al. (1999) já é tempo para uma reavaliação do taxon *Trypanosoma cruzi* e para estabelecer uma nomenclatura comum para essas linhagens que serviriam não somente para taxonomistas, mas também para a comunidade de pesquisadores que trabalham com o protozoário. Caracterizações genéticas adicionais dos sub-grupos dentro dessas linhagens representam um passo fundamental para o conhecimento das complexas manifestações clínicas e epidemiológicas da doença de Chagas.

## 6- CONCLUSÕES

---

- Três cepas, AMJM, BFS e NCS apresentaram parasitemia patente, enquanto uma cepa, NBR apresentou parasitemia sub-patente nos três grupos de camundongos estudados.
- Observou-se grande variabilidade individual na parasitemia nos sete camundongos de cada grupo, para todas as cepas que apresentaram parasitemia patente.
- Os períodos pré-patentes, picos médios de parasitemia e duração da fase aguda foram variáveis para todas as cepas estudadas. Todas as cepas apresentaram baixa parasitemia. As diferenças observados no pico da parasitemia foram estatisticamente significativas entre as cepas AMJM e NCS e entre as cepas BFS e NCS.
- Foram observadas apenas formas tripomastigotas largas durante todo o curso da infecção, para as três cepas com parasitemia patente. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas para os valores de comprimento do flagelo, comprimento do corpo e comprimento total entre as cepas AMJM e BFS e entre as cepas AMJM e NCS. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas para largura do corpo entre as três cepas estudadas.
- O comportamento de cada cepa, nos três grupos de camundongos analisados foi semelhante. As diferenças observadas na média do número de formas tripomastigotas sangüíneas, nos sete camundongos de cada grupo, nos dias avaliados não foram estatisticamente significativas.
- A taxa de mortalidade foi nula para todas as cepas estudadas.
- O estudo histopatológico mostrou presença de formas amastigotas no músculo cardíaco para as cepas AMJM e NBR. Reação inflamatória foi observada no músculo cardíaco para todas as cepas, nos músculos da parede intestinal para a cepa BFS, nos músculos esqueléticos para as cepas AMJM, BFS e NCS e no fígado para as cepas AMJM e NBR.

- Na caracterização molecular, a amplificação por PCR de parte do espaçador não transcrito do gene de mini-exon gerou um fragmento de 250 pb para as quatro cepas estudadas.
- Baseado no comportamento no animal experimental as quatro cepas foram classificadas no Biodema II.
- A análise molecular permitiu classificar as quatro cepas no grupo II
- Com os dados obtidos as quatro cepas foram classificadas como *T.cruzi* II.

## 7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

ACOSTA, N.; SAMUDIO, M.; LÓPEZ, E.; VARGAS, F.; YAKSIC, N.; BRENIÈRE, S.F.; ARIAS, A.R. Isoenzyme profiles of *Trypanosoma cruzi* from different areas of Paraguay. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.4, p.527-533, 2001.

ANDRADE, S.G. Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v.3, n.1, p.65-121, 1974.

ANDRADE, Z.A.; ANDRADE, SG. Patologia. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.A. (Eds.). ***Trypanosoma cruzi e doença de Chagas***. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1979. p.199-248.

ANDRADE, S.G.; ANDRADE, V.; ROCHA FILHO, F.D.; BARRAL NETTO, M. Análise antigênica de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.23, p.245-250, 1981.

ANDRADE, V.; BRODSKYN, C.; ANDRADE, S.G. Correlation between isoenzyme patterns and biological behaviour of different strains of *Trypanosoma cruzi*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.77, p.796-799, 1983.

ANDRADE, S.G. Morphological and behavioural characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.18 (Suppl.), p.39-46, 1985.

ANDRADE, S.G. Influence of *Trypanosoma cruzi* strain on the pathogenesis of chronic myocardopathy in mice. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.85, p.17-27, 1990.

ANDRADE, S.G.; MAGALHÃES, J.B. Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.30, n.1, p. 27-35, 1997.

ANDRADE, S.G. Patologia Experimental da doença de Chagas. In: BRENER Z, ANDRADE Z, BARRAL-NETO M (Eds.). ***Trypanosoma cruzi e doença de Chagas***. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.177-200.

ANDREWS, N.W. Living dangerously: how *Trypanosoma cruzi* uses lysosomes to get inside host cells, and then escapes into the cytoplasm. **Biological Research**, Santiago, v.26, p.65-67, 1993.

ARAÚJO, F.G.; REMINGTON, J.S. Characterization of stages and strains of *Trypanosoma cruzi* by analysis of cell membrane components. **The Journal of Immunology**, Bethesda, v.127, n.3, p.855-859, 1981.

ARAÚJO, S.M.; CHAIRI, E. Caracterização biológica de clones das cepas Y, CI e MR de *Trypanosoma cruzi* em camundongos C3H isogênicos. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.83, p.175-181, 1988.

ARAÚJO-JORGE, T. Modelos animais para o estudo in vivo da doença de Chagas e de seus aspectos histopatológicos. Camundongo. In: ARAÚJO-JORGE TC, CASTRO SL (Orgs.). **Doença de Chagas: Manual para experimentação Animal**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2000. p.133-139.

AUGUSTO-PINTO, L.; TEIXEIRA, S.M.R.; PENA, S.D.J.; MACHADO, C.R. Single-nucleotide polymorphisms of the *Trypanosoma cruzi* MSH2 gene support the existence of three phylogenetic lineages presenting differences in mismatch-repair efficiency. **Genetics**, Austin, v.164, p.117-126, 2003.

BADINEZ, O.S. Contribucion a la anatomia patologica de la enfermedad de Chagas experimental. **Biológica**, Santiago, v.3, p.3-52, 1945.

BANCO MUNDIAL. **La salud en los paises en desarrollo: éxitos y retos a enfrentar**. Informe sobre el desarrollo mundial 1993 – invertir en salud. Washington, DC: Banco Mundial, 1993. p.18-37.

BARATA, J.M.S.; ROCHA, R.M.; RODRIGUES, V.L.C.C.; FERRAZ FILHO, A.N. Primeiro caso autóctone de tripanossomíase americana do Estado do Acre (Brasil) e sua correlação com as cepas isoladas do caso humano e de triatomíneos silvestres da área. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.22, n.5, p.401-410, 1988.

BARKER, D.C. Molecular approaches to DNA diagnosis. **Parasitology**, London, v.99, p.S125-S146, 1989.

BELDA NETO, F.M. **Estudos sobre a existência de correlação entre os dados biométricos e o grau de patogenicidade de amostras humanas do *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909**. 1973. 71f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Farmácia e Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1973.

BIBLIOTECA VIRTUAL CARLOS CHAGAS. A descoberta de uma nova doença. Disponível em: < <http://www.prossiga.br/chagas/> >. Acesso em: 22 out. 2004.

BICE, D.E.; ZELEDÓN, R. Comparison of infectivity of strains of *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). **Journal of Parasitology**, Lawrence, v.56, p.663-670, 1970.

BOSSENO, M.F.; ESPINOZA, B.; SÁNCHEZ, B.; BRENIÈRE, S.F. Mexican *Trypanosoma cruzi* stocks: analysis of minicircle kDNA homologies by cross-hybridizations. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.95, n.4, p.473-476, 2000.

BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.4, n.6, p.389-396, 1962.



BRENER, Z.; CHIARI, E. Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.5, p.220-224, 1963.

BRENER, Z. The behaviour of slender and stout forms of *Trypanosoma cruzi* in the bloodstream of normal and immune mice. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Liverpool, v.63, p.215-220, 1969.

BRENER, Z.; CHIARI, E.; ALVARENGA, N.J. Observations of *Trypanosoma cruzi* strains maintained over 8-years period in experimentally inoculated mice. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.16, p.39-46, 1974.

BRIONES, M.R.S.; SOUTO, R.P.; STOLF, B.S.; ZINGALES, B. The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v.104, p.219-232, 1999.

BRISSE, S.; BARNABÉ, C.; TIBAYRENC, M. *Trypanosoma cruzi*: how many relevant phylogenetic subdivisions are there? **Parasitology Today**, Cambridge, v.14, n.5, p.178-179, 1998.

BUAINAIN, A.; BELDA NETO, F.M.; GIAZZI, J.F.; ROSA, J.A.; MARTINI, A.S. Isolamento e caracterização de amostras de *Trypanosoma cruzi* em pacientes chagásicos crônicos residentes na região de Araraquara – SP. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.82, Suppl. I, p.54, 1987.

CAMANDAROBA, E.L.P.; CAMPOS, R.F.; MAGALHÃES, J.B.; ANDRADE, S.G. Clonal structure of *Trypanosoma cruzi* Colombian strain (biodeme Type III): biological, isoenzymic and histopathological analysis of seven isolated clones. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.34, n.2, p.151-157, 2001.

CAMANDAROBA, E.L.P.; PINHEIRO LIMA, C.M.; ANDRADE, S.G. Oral transmission of Chagas disease: importance of *Trypanosoma cruzi* biotype in the intragastric experimental infection. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.44, n.2, p.97-103, 2002.

CAMPOS, M.F.; ANDRADE, S.G. Characterization of subpopulations (clones and subclones) of the 21 SF strain of *Trypanosoma cruzi* after long lasting maintenance in the laboratory. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.91, n.6, p.795-800, 1996.

CARNEIRO, M.; ROMANHA, A.J.; CHIARI, E. Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains from different zymodemes and schizodemes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.86, n.4, p.387-393, 1991.

CEVALLOS, A.M.; HERNÁNDEZ, R. *Trypanosoma cruzi* y la enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana). In: MARTÍNEZ ROMERO, J.; MARTÍNEZ ROMERO, E. (Eds.). **Micróbios**. Disponível em:  
<<http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/Cap15/capitulo.html>> Acesso em:  
18 ago.2004.

CHAGAS FILHO, C. Cenas da vida de Carlos Chagas. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.31, n.7, p.5-14, 1979.

CHAGAS FILHO, C. A descoberta da doença de Chagas. Disponível em:  
< <http://www.prossiga.br/chagas/> >. Acesso em: 22 out. 2004.

CHIA-TUNG PAN, S. *Trypanosoma cruzi*: ultrastructure of morphogenesis in vitro and in vivo. **Experimental Parasitology**, New York, v.46, p.92-107, 1978.

CLARK, C.G.; PUNG, O.J. Host specificity of ribosomal DNA variation in sylvatic *Trypanosoma cruzi* from North America. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v.66, p.175-179, 1994.

COURA, J.R.; FERREIRA, L.F.; RUBENS, J.; PEREIRA, N.C.; SILVA, J.R. Tripanosoma do “complexo cruzi” em reservatório silvestre no Estado da Guanabara. Estudo de sua patogenicidade. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.8, p.125-133, 1966.

COURA, J.R.; WILLCOX, H.P.F.; ARBOLEDA NARANJO, M.A.; FERNANDES, O.; PAIVA, D.D. Chagas' disease in the brazilian amazon. III. A cross-sectional study. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.37, n.5, p.415-420, 1995.

CUERVO, P.; CUPOLILLO, E.; SEGURA, I.; SARAIVIA, N.; FERNANDES, O. Genetic diversity of Colombian sylvatic *Trypanosoma cruzi* isolates revealed by the Ribosomal DNA. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro v.97, n.6, p.877-880, 2002.

DEANE, M.P.; BRITO, T.; DEANE, L.M. Pathogenity to mice of same strains of *Trypanosoma cruzi* isolated from wild animal. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.5, p.225-235, 1963.

DEANE, M.P.; SOUZA, M.A.; PEREIRA, N.M.; GONÇALVES, A.M.; MOMEN, H.; MOREL, C.M. *Trypanosoma cruzi*: inoculation schedules and re-isolation methods select individual strains from doubly infect mice as demonstrated by schizodeme and zymodeme. **Journal of Protozoology**, New York, v.31, p.276-280, 1984.

De CARLI, G.A. Exame do sangue. In: \_\_\_\_\_ **Parasitologia Clínica**: Seleção de Métodos e Técnicas de Laboratório para o Diagnóstico das Parasitoses Humanas. São Paulo: Atheneu, 2001. p.291-312.

De SOUSA, M.A. Morphobiological characterization of *Trypanosoma cruzi*, Chagas, 1909 and its distinction from other trypanosomes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.94 (Suppl. 1), p.205-210, 1999.

De SOUZA, W. A short review on the morphology of *Trypanosoma cruzi*: from 1909 to 1999. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.94, Suppl. I, p.17-36, 1999.

DEVERA, R.; ILLARRAMENDI, X.; MONTOYA-ARAÚJO, R.; PIRMEZ, C. FERNANDES, O.; COURA, J.R. Biodemas de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas de humanos de três áreas endêmicas de Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.35, n.4, p.323-330, 2002.

DEVERA, R.; FERNANDES, O.; COURA, J.R. Should *Trypanosoma cruzi* be called "cruzi" complex ? A review of the parasite diversity and the potential of selecting population after *in vitro* culturing and mice infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.98, n.1, p.1-12, 2003.

DIAS, E.; FREITAS FILHO, L. Introdução ao estudo biométrico dos hemoflagelados do gênero *Schizotrypanum*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.38, n.3, p.427-436, 1943.

DIAS, J.C.P. The indeterminate form of human chronic Chagas'disease. A clinical epidemiological review. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.22, n.3, p.147-156, 1989.

DIAS, J.C.P.; SCHOFIELD, C.J. The evolution of Chagas Disease (American Trypanosomiasis) control after 90 years since Carlos Chagas discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.94, Suppl. 1, p.103-121, 1999.

DIAS, J.C.P. Epidemiologia. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.A.; BARRAL NETO, M. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.48-74.

DOST, C.K.; ALBUQUERQUE, S.; HEMLEBEN, V.; ENGELS, W.; PRADO Jr, J.C. Molecular genetic characterization of different *Trypanosoma cruzi* strains and comparison of their development in *Mus musculus* and *Calomys callosus*. **Parasitology Research**, Berlin, v.88, p.609-616, 2002.

DVORAK, J.A.; HARTAMAN, D.L.; MILES, M.A. *Trypanosoma cruzi*: correlation of growth kinetics to zymodeme type in clones derived from various sources. **Journal of Protozoology**, New York, v.31, p.472-474, 1989.

FEDERIC, E.E.; ABELMANN, W.B.; NEVA, F.A. Chronic and progressive myocarditis and myositis in C3H mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.13, p.272-280, 1964.

FERNANDES, C.D.; MURTA, S.M.F.; CERÁVOLO, I.P.; KRUG, L.P.; VIDIGAL, P.G.; STEINDEL, M.; NARDI, N.; ROMANHA, A.J. Characterization of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from chronic chagasic patients, triatomines and opossums naturally infected from the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.92, n.3, p.343-351, 1997.

FERNANDES, O.; STURM, N.R.; DERRE, R.; CAMPBELL, D.A. The mini-exon gene: a genetic marker for zymodeme III of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v.95, p.129-133, 1998.

FERNANDES, O.; MANGIA, R.H.; LISBOA, C.V.; PINHO, A.P.; MOREL, C.M.; ZINGALES, B.; CAMPBELL, D.A.; JANSEN, A.M. The complexity of the sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi* in Rio de Janeiro state (Brazil) revealed by the non-transcribed spacer of the mini-exon gene. **Parasitology**, London, v.118, p.161-166, 1999.

FERNANDES, O.; SANTOS, S.S.; JUNQUEIRA, A.C.V.; JANSEN, A.M.; CUPOLILLO, E.; CAMPBELL, D.A.; ZINGALES, B.; COURA, J.R. Populational heterogeneity of Brazilian *Trypanosoma cruzi* isolates revealed by the mini-exon and ribosomal spacers. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.94, Suppl. I, p.195-197, 1999 a.

FERNANDES, O.; SANTOS, S.S.; CUPOLILLO, E.; MENDONÇA, B.; DERRE, R.; JUNQUEIRA, A.C.V.; SANTOS, L.C.; STURM, N.R.; NAIFF, R.D.; BARRET, T.V.; CAMPBELL, D.A.; COURA, J.R. A mini-exon multiplex polymerase chain reaction to distinguish the major groups of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in the Brazilian Amazon. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.95, p. 97-99, 2001.

GALVÃO, C.; CARCAVALLO, R.; ROCHA, D.S.; JURBERG, J. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution with nomenclatural and taxonomic notes. **Zootaxa**, Auckland, v.202, p.1-36, 2003.

GOMES, M.L.; TOLEDO, M.J.O.; NAKAMURA, C.V.; BITTENCOURT, N.L.; CHIARI, E.; ARAÚJO, S.M. *Trypanosoma cruzi*: genetic group with peculiar biochemical and biological behavior. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.98, n.5, p.649-654, 2003.

HAUSCHKA, T.S. Persistence of strain-specific behaviour in two strains of *Trypanosoma cruzi* after prolonged transfer through inbred mice. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v.35, p.593-599, 1949.

HIGUCHI, M.L.; De BRITO, T.; REIS, M.M.; BARBOSA, A.; BELLOTTI, G.; PEREIRA-BARRETO, A.C.; PILLEGI, F. Correlation between *Trypanosoma cruzi* parasitism and myocardial inflammatory infiltrate in human chronic chagasic myocarditis: light microscopy and immunohistochemical findings. **Cardiovascular Pathology**, New York, v.2, n.2, p.101-106, 1993.

JEFFREYS, A.J.; WILSON, V.; THEIN, S.L. Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA. **Nature**, London, v.314, p.67-73, 1985.

JONES, E.M.; COLLEY, D.G.; TOSTES, S.J.; LOPES, E.R.; VNENCAK-JONES, C.L.; McCURLEY, T.L. Amplification of *Trypanosoma cruzi* DNA sequences from human inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.48, p.348-357, 1993.

KIERSZENBAUM, F. Chagas' disease and the autoimmunity hypothesis. **Clinical Microbiology Review**, Washington, v.12, p.210-223, 1999.

KOLLIEN, A.H.; SCHAUD, G.A. The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. **Parasitology Today**, Cambridge, v.16, n.9, p.381-387, 2000.

KUMAR, R.; KLINE, I.K.; ABELMAMM, W.H. Experimental *Trypanosoma cruzi* myocarditis. Relative effects upon the right and left ventricles. **American Journal of Pathology**, New York, v.57, p.31-48, 1969.

LANA, M.; TAFURI, W.L. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. In: NEVES, D.P.; MELO, A.L.; GENARO, O.; LINARDI, P.M. **Parasitologia Humana**. 10 ed. São Paulo: Atheneu, 2000. p.73-96.

LIMA, V.S.; MANGIA, R.H.R.; CARREIRA, J.C.; MARCHEWSKI, R.S.; JANSEN, A.M. *Trypanosoma cruzi*: correlations of biological aspects of the life cycle in mice and Triatomines. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.94, n.3, p.397-402, 1999.

LOPES, E.R.; CHAPADEIRO, E. Anatomia patológica da doença de Chagas humana. In: DIAS, J.C.P.; COURA, J.R. (Orgs.). **Clínica e Terapêutica da doença de Chagas. Uma abordagem prática para o Clínico Geral**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1997. p.67-84.

LUQUETTI, A.O. Practical aspects of Chagas disease. **Parasitology Today**, Cambridge, v.10, n.8, p.287-288, 1994.

MACEDO, A.M.; MARTINS, M.S.; CHIARI, E.; PENA, S.D.J. DNA fingerprinting of *Trypanosoma cruzi*: a new tool for characterization of strains and clones. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v.55, p.147-154, 1992.

MACEDO, A.M.; PENA, S.D.J. Genetic Variability of *Trypanosoma cruzi*: implications for the pathogenesis of Chagas Disease. **Parasitology Today**, Cambridge, v.14, n.3, p.119-124, 1998.

MACHADO, C.A.; AYALA, F.J. Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v.98, p.7396-7401, 2001.

MAGALHÃES, J.B.; ANDRADE, S.G.; SHERLOCK, I. *Trypanosoma cruzi* strains: behavior after passage into autochthonous or foreign species of triatomines (biological and biochemical patterns). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.38, p.23-28, 1996.

MARIM, R.G. **Definição de parâmetros epidemiológicos e parasitológicos da doença de Chagas em Santander – Colômbia, e características de seu agente etiológico**. 2003. 154 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2003.

MARTINS, L.P.A. **Verificação da susceptibilidade de três espécies Triatominae (Hemiptera Reduvidae) à infecção por duas cepas de *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastidae, Trypanosomatidae) utilizando xenodiagnóstico artificial**. 1999. 101 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 1999.

MARTINS, L.P.A.; CASTANHO, R.E.P.; ROSA, J.A.; SILVA, L.C.; GODOY, C.A.P.; ROSA, R.M. Caracterização biológica, histopatológica e análise de ácido nucléico de uma cepa de *Trypanosoma cruzi* da região de Marília, SP. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.36, n.1, p.35-39, 2003.

McCARTHY-BURKE, C.; TAYLOR, Z.A.; BUCK, G.A. Characterization of spliced leader genes and transcripts in *Trypanosoma cruzi*. **Gene**, Amsterdam, v.82, p.177-189, 1989.

MELO, R.C.; BRENER, Z. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v.64, p.475-482, 1978.

MEYER, H.; OLIVEIRA, M.X. Cultivation of *Trypanosoma cruzi* in tissue culture: a four year study. **Parasitology**, London, v.39, p.91-94, 1948.



MILES, M.A.; TOYE, P.J.; OSWALD, S.C.; GODFREY, D.G. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi* circulating independently in a rural area of Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.71, n.3, p.217-225, 1977.

MILES, M.A.; SOUZA, A.; PÓVOA, M.; SHAW, J.J.; LAINSON, R.; TOYÉ, P.J. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patient with Chagas disease in Amazonian, Brazil. **Nature**, London, v.272, p.819-821, 1978.

MILES, M.A.; LANHAM, S.M.; SOUZA, A.A.; POVOA, M. Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.74, p.221-237, 1980.

MILES, M.A.; CEDILLOS, R.A.; POVOA, M.M.; SOUZA, A.A.; PRATA, A.; MACEDO, V. Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas' disease **Lancet**, London, v.1, p.1338-1340, 1981.

MILES, M.A.; APT, W.; WIDMER, G.; PÓVOA, M.M.; SCHOFIELD, C.J. Isozyme heterogeneity and numerical taxonomy of *Trypanosoma cruzi* stocks from Chile. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.78, p.526-535, 1984.

MONCAYO, A. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone Countries. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.98, n.5, p.577-591, 2003.

MOREL, C.; SIMPSON, L. Characterization of pathogenic trypanosomatidae by restriction endonuclease fingerprinting of kinetoplast DNA minicircles. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.29 (Suppl.), p.1070-1074, 1980.

MOREL, C.; CHIARI, E.; CAMARGO, E.P.; MATTEI, D.M.; ROMANHA, A.J.; SIMPSON, L. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. **Proceeding National Academy of Science USA**, Washington, v.77, p.6810-6814, 1980.

MOREL, C.M.; DEANE, M.P.; GONÇALVES, A.M. The complexicity of *Trypanosoma cruzi* populations revealed by schizodeme analysis. **Parasitology Today**, Cambridge, v.2, p.97-100, 1986.

NAI, G.A.; FERRO, L.; GALLE, L.C.; QUATROCHI, P.J.; GIROTO, L.A. Procedimentos de coloração dos preparados cito e histológicos – uma nova proposta. **Revista LAES & HAES**, São Paulo, v.147 p.123-128, 2004.

OLIVEIRA, E.C.; STEFANI, M.M.A.; LUQUETTI, A.O.; VÊNCIO, E.F.; MOREIRA, M.A.R.; SOUZA, C.; REZENDE, J.M. *Trypanosoma cruzi* and experimental Chagas disease: characterization of a stock isolated from a patient with associated digestive and cardiac form. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.26, p.25-33, 1993.

OLIVEIRA, R.P.; MACEDO, A.M.; CANTOR, C.R.; SMITH, C.L.; PENA, S.D. Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites. **Proceeding of the National Academy of Science USA**, Washington, v.95, p.3776-3780, 1998.

PETANA, W.B.; COURA, J.R. Experimental studies on *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* straisn isolated from man, from animals and from triatomine bugs in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.8, n.6, p.315-323, 1974.

PHILLIPS, N.R. Experimental studies on the quantitative transmission of *Trypanosoma cruzi*. Considerations regarding standardization of material. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Liverpool, v.54, p.60-70, 1960.

PINTO, C. Tripanosomiasis cruzi (doença de Carlos Chagas) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.37, n.4, p.443-537, 1942.

PINTO, P.L.S.; TAKAMI, R.; NUNES, E.V.; GUILHERME, C.S.; OLIVEIRA Jr, OC; GAMA-RODRIGUES, J.; OKUMURA, M. Life cycle of *Trypanosoma cruzi* (Y strain) in mice. **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo**, São Paulo, v.54, n.5, p.141-146, 1999.

PRATA, A. Chagas' health disease. **Cardiologia**, Roma, v.52, p.79-96, 1968.

RASSI, A.; LUQUETTI, A.O.; RASSI Jr, A.; ASSI, A.G. Fase aguda da doença de Chagas adquirida por via transfusional. Estudo de 12 pacientes. **Arquivos Brasileiro de Cardiologia**, São Paulo, v.63, Supl. 1, p.135, 1994.

REZENDE, J.M.; LUQUETTI, A.O. Chagas' disease and the nervous system. **Pan-American Health Organization**, Scientific Publication n.547, p.160-183, 1994.

REZENDE, J.M.; MOREIRA, H. Forma digestiva da doença de Chagas. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.A.; BARRAL NETO, M. ***Trypanosoma cruzi e doença de Chagas***. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.297-343.

ROBELLO, C.; GAMARRO, F.; CASTANYS, S.; ALVAREZ-VALIN, F. Evolutionary relationships in *Trypanosoma cruzi*: molecular phylogenetics supports the existence of a new major lineage of strais. **Gene**, Amsterdam, v.246, p.331-338, 2000.

ROCHA, A.; De MENEZES, A.C.; Da SILVA, A.M.; FERREIRA, M.S.; NISHIOKA, S.A.; BURGARELLI, M.K.; ALMEIDA, E.; TURCATO, J.G.; METZE, K.; LOPES, E.R. Pathology of patients with Chagas'disease and acquired immunodeficiency syndrome. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.50, p.261-268, 1994.

RODRIGUEZ , A.; SAMOFF, E.; RIOULT, M.G.; CHUNG, A.; ANDREWS, N.W. Host cell invasion by trypanosome requires lysosomes and microtubule/kinesin-mediated transport. **Journal of Cell Biology**, New York, v.134, p.349-362, 1996.

ROMANHA, A.J.; PEREIRA, A.A.S.; CHIARI, E.; KILGOUR, V. Isoenzyme patterns of cultured *Trypanosoma cruzi*: changes after prolonged subculture. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v.62B, p.139-142, 1979.

ROSA, J.A.; BELDA NETO, F.M.; BUAINAIN, A.; GIAZZI, J.F.; MARTINI, A.S.; CUNHA FILHO, C.; RIBEIRO, C.A. Características de cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas de chagásicos crônicos. In: JORNADA FARMACÊUTICA DA UNESP, 34, 1987, Araraquara. **Resumos...** Araraquara:1987. p.18.

ROSSI, M.A.; RAMOS, S.G. Coronary microvascular abnormalities in Chagas'disease. **American Heart Journal**, St. Louis, v.132, n.1, p.207-210, 1996.

RUIZ, R.C.; FAVORETO Jr, S.; DORTA, M.L.; OSHIRO, M.E.M.; FERREIRA, A.T.; MANQUE, P.M. Infectivity of *Trypanosoma cruzi* strains is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca<sup>2+</sup> signaling activity. **Biochemical Journal**, London, v.330, p.505-511, 1998.

SANTOS, R.R.; HUDSON, L. Denervation and immune response in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **Clinical and Experimental Immunology**, London, v.44, p.349-354, 1981.

SATELLITE MEETING. Recomendations from a Satellite Meeting – International Symposium to commemorate the 90<sup>th</sup> anniversary of the discovery of Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.94, Suppl. I, p.429-432, 1999.

SCHLEMPER Jr, B.R.; ÁVILA, C.M.; COURA, J.R.; BRENER, Z. Course of infection and histopathological lesions in mice infected with seventeen *Trypanosoma cruzi* strais isolated from chronic patients. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.16, p.23-30, 1983.

SCHLEMPER Jr, B.R.; ISHIDA, M.M.I.; STEINDEL, M.; GARGIONI,R. Tripomastigota muito largo como padrão morfológico de cepas do *Trypanosoma cruzi* do extremo sul do Brasil ? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.81, n.2, p.191-198, 1986.

SCHMUNIS, G.A. *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas disease status in the blood supply in endemic and nonendemic countries. **Transfusion**, Philadelphia, v.31, n.6, p.547-557, 1991.

SHERLOCK, I.A. Vetores. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.A.; BARRAL-NETO, M. ***Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas***. 2. Ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.21-40.

SILVA, L.H.P.; NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. **Folia Clínica et Biologica**, São Paulo, v.20, p.191-207, 1953.

SILVA, R.A.; CARVALHO, M.E.; RODRIGUES, V.L.C.C. Doença de Chagas. Disponível em: [http:// www.prossiga.br/chagas/](http://www.prossiga.br/chagas/) . Acessado em 22 out.2004.

SILVEIRA, A.C.; REZENDE, D.F. Epidemiologia e controle da transmissão vetorial da Doença de Chagas no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 27, Suppl. III, p.11-22, 1994.

SILVEIRA, J.F. Biologia Molecular do *Trypanosoma cruzi*. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.A.; BARRAL-NETO, M. ***Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas***. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.127-152.

SILVEIRA, A.C. Profilaxia. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.A.; BARRAL-NETO, M. ***Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas***. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.75-87.

SIMPSON, L.; THIEMANN, O.H.; SAVILL, N.J.; ALFONZO, J.D.; MASLOV, D.A. Evolution of RNA editing in trypanosome mitochondria. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v.97, p.6986-6993, 2000.

SOARES, M.J.; SOUTO-PADRÓN, T.; BONALDO, M.C.; GOLDENBERG, S.; De SOUZA, W. A stereological study of the differentiation process in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Research**, Berlin, v.75, p.522-527, 1989.

SOUTO, R.P.; ZINGALES, B. Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v.62, p.45-52, 1993.

SOUTO, R.P.; FERNANDES, O.; MACEDO, A.M.; CAMPBELL, D.A.; ZINGALES, B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v.83, p.141-152, 1996.

STEINDEL, M.; DIAS NETO, E.; MENEZES, C.L.P.; ROMANHA, A.J.; SIMPSON, A.J.G. Random amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma cruzi* strains. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v.60, p.71-80, 1993.

TARDIEUX, I.; WEBSTER, P.; RAVESLOOT, J.; BORON, W.; LUNN, J.A.; HEUSER, J.E.; ANDREWS, N.W. Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. **Cell**, Cambridge, v.71, p.1117-1130, 1992.

TEIXEIRA, M.L.; REZENDE, F.J.; FIGUEIREDO, F.; TEIXEIRA, A.R. Chagas'disease: selective affinity and cytotoxicity of *Trypanosoma cruzi*-immune lymphocytes to parasympathetic ganglion cells. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, n.75, p.33-45, 1980.

TIBAYRENC, M.; BRENIERE, S.F. *Trypanosoma cruzi*: major clones rather than principal zymodemas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.83, Suppl. 1, p.249-255, 1988.

TOYÉ, P.J. Isoenzyme variation in isolates of *Trypanosoma cruzi*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v.68, p.147, 1974.

TYLER, K.M.; ENGMAN, D.M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **International Journal for Parasitology**, New York, v.31, p.472-481, 2001.

VAGO, A.; MACEDO, A.; OLIVEIRA, R.; ANDRADE, L.; CHIARI, E.; GALVÃO, L.; ÁVILA REIS, D.; PEREIRA, M.E.; SIMPSON, A.; TOSTES, S.; PENA, S. Kinetoplast DNA signatures of *Trypanosoma cruzi* strains obtained directly from infected tissues. **American Journal of Pathology**, New York, v.146, n.6, p.2153-2159, 1996.

WANDERLEY, D.M.V.; GONZALES, T.T.; PEREIRA, M.S.C.A.; NASCIMENTO, R.D.; MORAES-SOUZA, H. Controle da hemoterapia e da doença de Chagas transfusional: 1988 e 1990. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.27, n.6, p.430-435, 1993.

WENDEL, S.; BRENER, Z. Historical aspects. In: WENDEL, S. et al. (ed.). **Chagas disease (american trypanosomiasis): Its impact on transfusional and clinical medicine**. São Paulo: ISBT Brazil'92. (Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia), 1992. p.5-12. Disponível em:

< <http://www4.prossiga.br/Chagas/doenca/pdf/dc-ah.579.pdf> > Acesso em 18 ago.2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of Chagas Disease. Report of a WHO Expert Committee. Geneva. **WHO Technical Report Series**, 811, p.95, 1991.

ZELEDÓN, R.; RABINOVICH, J.E. Chagas disease: an ecological appraisal with special emphasis on its insect vectors. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v.26, p.101-133, 1981.

ZINGALES, B.; SOUTO, R.P.; MANGIA, R.H.; LISBOA, C.V.; CAMPBELL, D.A.; COURA, J.R.; JANSEN, A.M.; FERNANDES, O. Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. **International Journal for Parasitology**, New York, v.28, p.105-112, 1998.

ZINGALES, B.; STOLF, B.S.; SOUTO, R.P.; FERNADES, O.; BRIONES, M.R.S. Epidemiology, biochemistry and evolution of *Trypanosoma cruzi* lineages based on ribosomal RNA sequences. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.94, Suppl. I, p.159-164, 1999.